



Modélisation statistique des associations et des interactions entre des parasites transmis par des vecteurs, à partir de données issues d'études transversales

Elise Vaumourin

► To cite this version:

Elise Vaumourin. Modélisation statistique des associations et des interactions entre des parasites transmis par des vecteurs, à partir de données issues d'études transversales. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22489 . tel-01153501

HAL Id: tel-01153501

<https://theses.hal.science/tel-01153501>

Submitted on 19 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 638

Thèse

Présentée à l'INRA de Clermont-Ferrand – Theix
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(SPÉCIALITÉ : ECOLOGIE – EPIDEMIOLOGIE)

Soutenue publiquement le 26 septembre 2014

Elise Vaumourin

**Modélisation statistique des associations et des interactions
entre des parasites transmis par des vecteurs,
à partir de données issues d'études transversales**

Directrice de thèse : **Gwenaél Vourc'h**
Co-directrice de thèse : **Muriel Vayssier-Taussat**
Co-encadrant : **Patrick Gasqui**

Devant le jury composé de :

Président :	Serge Morand , Directeur de Recherche, ISEM – CIRAD, Montpellier
Examineur :	Benoit Durand , Directeur de Recherche, ANSES, Maisons-Alfort
Examineur :	Hicham El Alaoui , Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Rapporteuse :	Emmanuelle Gilot-Fromont , Professeur, VetAgro Sup, Lyon
Rapporteur :	Didier Calavas , Ingénieur de Recherche, ANSES, Lyon
Directrice de thèse :	Gwenaél Vourc'h , Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand – Theix
Co-directrice de thèse :	Muriel Vayssier-Taussat , Directeur de Recherche, INRA, Maisons-Alfort

Unités : INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, Route de Theix 63122 Saint Genès Champanelle
et INRA-ANSES-ENVA, USC BIPAR, 23 rue du Général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort.

Modélisation statistique des associations et des interactions entre des parasites transmis par des vecteurs, à partir de données issues d'études transversales

Résumé : Le multiparasitisme et surtout les associations qui en découlent, ont une grande influence sur l'écologie des parasites concernés. Elle est d'autant plus grande que les parasites peuvent interagir et ainsi modifier leurs effets sur les hôtes. Cependant, l'identification des associations et interactions de parasites est complexe au niveau populationnel. Notre objectif était de modéliser les associations et les interactions multiparasitaires, notamment dans le cadre des parasites d'importance médicale, vétérinaire ou agronomique. Nous avons tout d'abord réalisé une revue bibliographique sur les différentes causes et conséquences du multiparasitisme ainsi que sur les méthodes et outils disponibles pour comprendre les phénomènes qui le génèrent. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la détection des associations multiparasitaires. Nous avons développé une nouvelle méthode « de screening des associations » pour tester statistiquement la présence d'associations de parasites à une échelle globale. Nous avons utilisé cette méthode pour identifier les associations et pour révéler précisément les parasites associés au sein de diverses populations d'hôtes. Puis, nous avons étudié les interactions entre les parasites. Nous avons développé un modèle pour identifier les interactions entre deux parasites vectorisés et persistants chez un hôte, à partir de données issues d'études transversales. L'une des voies de progression de la connaissance sur les interactions est la prise en compte des facteurs de risque communs. La prise en compte des interactions contribue à améliorer le diagnostic, les traitements et la prévention des maladies infectieuses.

Mots-clés : multiparasitisme, interactions, associations, parasites, vecteurs, modélisation statistique, études transversales.

Statistical modelling of associations and interactions between vector borne parasites, using data from cross-sectional studies

Abstract: Multiparasitism and specifically statistical associations among parasites, have a strong influence on the ecology of parasites. This influence reinforced when parasites interact and thus modify their effect on hosts. However, the identification of associations and interactions between parasites is complex at the population level. Our aim was to model multi-parasite associations and interactions, in particular for parasites of medical, veterinary or agricultural importance. We first present a review of the literature on the different causes and consequences of multiparasitism and the methods and tools available to better understand the phenomena that generate them. In a second step we worked on the detection of multi-parasite associations. We developed a new approach « association screening » to statistically test the presence of multi-parasite associations on a global scale. We used this method to identify associations and to reveal precisely associated parasites in different host populations. Then, we focused on the study of interactions between parasites. We developed a model to identify the interactions between two vector-borne and persistent parasites in a host, using data from cross-sectional studies. One way to increase our capacity to detect parasite interactions in populations is the taking into account common risk factors. Taking into account interactions increases diagnosis, treatments and prevention of infectious diseases.

Key-words: multiparasitism, interactions, associations, vectors, statistical modelling, cross-sectional studies.

Unités : INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, Route de Theix 63122 Saint Genès Champanelle et INRA-ANSES-ENVA, USC BIPAR, 23 rue du Général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à Gwenaël pour m'avoir permis de faire partie de l'unité d'Epidémiologie Animale en tant qu'« apprentie chercheur ». En fait, 3 ans c'est court et bien rempli...de découvertes, de joies, de réflexions, de doutes et d'aventures parfois « périlleuses » (ou plutôt qui semblent l'être) mais dont on sort grandi. Merci infiniment Gwenaël, je suis heureuse d'avoir grandi à tes côtés.

Je tiens aussi à remercier Muriel, pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des Bartonella, l'infiniment petit qui se trouve être partout. Merci d'avoir suivi le déroulement de ma thèse malgré la distance. Un grand merci pour tes conseils pertinents et ton accueil chaleureux.

Merci à toi Patrick pour m'avoir fait découvrir l'univers des statistiques. Ces trois années de réflexions et d'échanges furent pour moi une merveilleuse aventure à l'interface de la biologie et des statistiques.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de venir se perdre dans les montagnes auvergnates pour assister à ma soutenance de thèse. Merci à Emmanuelle Gilot-Fromont et à Didier Calavas d'en être les rapporteurs ainsi qu'à Serge Morand, Benoît Durand et Hicham El Alaoui d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier tous les collaborateurs qui ont contribué à ce travail. Un immense merci à Xavier Lambin, Sandra Telfer, Ulrike Seitzer, Diaeldin Salih, Jean-Louis Chapuis, Benoît Pisanu et les membres du projet Patho-Id pour m'avoir confié leurs données et un peu de leur temps précieux pour discuter de mon travail.

Je remercie également les membres de mes comités de thèse d'avoir pris le temps de venir discuter de mon projet de thèse. Merci à Gaël Thébaud, Jean-François Cosson, Jean-Louis Chapuis, Luc Chabanne et Suzanne Bastian pour vos conseils précieux.

Cette thèse a pu prendre forme grâce au soutien financier du département de Santé Animale de l'Institut National de Recherche Agronomique, de la Région Auvergne, du Métaprogramme INRA MEM (projet Patho-Id) et du projet Européen EDENext (UE FP7-261504). Je les en remercie. La thèse a été cataloguée par le Comité d'EDENext comme EDENext288 (<http://www.edenext.eu>).

Je tiens également remercier l'ensemble des membres du groupe de travail «Tiques et Maladies à Tiques» du «Réseau Ecologie des Interactions Durables» pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons partagées.

1000 Mercis à mes cobuottes auvergnates avec qui j'ai partagé cette grande aventure. Merci à vous Maude, Amélie et Angélique pour votre gentillesse, tous ces moments où on a mis à rude épreuve nos zygomatiques, et pour ceux plus tristes où on a su se serrer les coudes. Les pauses thé et chocolat auront un peu moins de saveur sans vous.

Je n'oublierai pas non plus le Docteur Bord et sa royale majesté Thérèse pour les pauses sociales et la découverte de la Forêt de Sénart. Merci à toi Séverine pour m'avoir fait découvrir la peinture sur tiques....elles sont quand même plus belles en rose....et pour m'avoir permis de prendre conscience qu'il pouvait s'en passer des choses en 2 minutes 30. Merci à toi Valérie pour tous ces petits moments remplis de joie. Merci à vous, Sébastien et

Xavier, pour tous ces échanges pleins de conseils avisés. Merci à toi Nelly pour ces petits moments de midi partagés. Jocelyn, je te promets je me mets au LaTeX rapidement tous tes arguments ont fini par me convaincre. Merci à vous Myriam et David pour votre aide pour comprendre l'univers des chaînes de Markov et pour vos conseils avisés sur R et sur la gestion du stress...je vais faire mon possible pour les mettre en application. Un grand merci à toi Françoise pour ton aide précieuse pour survivre au monde complexe de l'administration. Merci à toi Christian, notre voisin de l'intérieur, pour tes conseils et ta bonne humeur. Merci à toi Elsa pour nos échanges notamment de bons plans culturels. Merci à toi Laurent d'avoir élu domicile de temps en temps dans notre bureau et de l'avoir éclairé de tes lumières et de ta bonne humeur. Merci à toi notre nouveau coburot, Sylvain, pour ton humour, nos moments de réflexion philosophique et ton amour de la bière. Je n'oublierai pas non plus tous les stagiaires (Aurélien, Valentin, Mathilde, Mathieu, Damien, Marina, Maxime, Maxime, Noémie, Doha, Elodie, Théo, Romain, Emilie, Zakaria, Vincent, Arnaud, Axel, Sabine, Simon, Jennifer, Laura, Silène) qui ont apporté tout plein de bonne humeur au moment de « la saison des stagiaires ».

Les mots me manquent chères coburottes parisiennes (ou alfortoizes) pour vous exprimer mon immense reconnaissance pour votre infinie gentillesse, votre accueil chaleureux et vos multiples conseils. Merci à toi Danielle pour ces petits tours du lac de Créteil pleins de complicité et de découvertes. Merci à toi Martine, ma vraie coburotte, pour ces beaux moments partagés au rythme de la zumba. Et merci à toi Evelyne pour toutes tes gentilles attentions. La pause pomme et vos rires sont gravés à tout jamais dans mon cœur.

Le bâtiment H est une petite maison remplie de personnes magnifiques. Merci à toi Jean-Philippe pour m'avoir fait découvrir le laboratoire et pour tes conseils de doctorant averti. Merci à vous, Lorraine et Thibaud, d'avoir fait de ma venue à Maisons-Alfort une magnifique et délicieuse aventure (cf. La première gorgée de bière et autres plaisirs minuscules). Merci à la belle équipe de la SEPIC, Nicolas, Jennifer et Elodie, pour sa bonne humeur toujours au rendez-vous. Merci à vous, Françoise et Dominique, pour m'avoir accueillie la toute première fois dans votre beau bureau. Merci à toi Oana, je suis très heureuse d'avoir été ta co-PCR. Merci à toi Liu pour nos brefs moments d'échanges pleins de malices. Merci aux « Sara(h) » pour votre gentillesse. Merci à toi Matthieu pour ne pas avoir filtré mes coups de téléphone et pour m'avoir toujours réservé un accueil chaleureux. Merci à toi Elodie pour tes petits mots gentils.

Chère Dream Team, je ne vous oublie pas....comment vous oublier après toutes ces « merveilleuses » aventures aux quatre coins de la France et du Monde. Papy Aliou, Mamy Sidney, Papy Bruno et la petite Manon, j'ai une immense chance de vous avoir rencontrés. A très bientôt pour de nouvelles aventures !

Je remercie ma deuxième famille, Kim, Benjamin, Guillaume, Nathalie, Nadège, Charlotte, Junie, Emilie, Nicolas et Natacha, pour tous ces bons moments partagés sous le soleil de Montpellier, Saint Amant Tallende et Montréal.

Une petite pensée pour ceux avec qui j'ai commencé l'aventure de l'écologie, Nicolas, Ronan, Claire-Marine, Vincent, Miia et Mickaël, malgré la distance vous restez des ancres de rigolade avec qui c'est toujours un délice d'écrire une nouvelle histoire du « Père Castor ».

Merci à celles qui ont fait briller encore plus fort le soleil de Montpellier, Anne-Christine, Laurène, Elodie, Camille et Sarah.

Merci à toi très cher co-randonneur grâce à toi j'ai découvert l'Auvergne autrement.

Merci à toi Octavie pour avoir créé et partagé de nombreuses pauses soleil.

Merci à toi Gaëlle pour avoir bravé le froid auvergnat et invité le soleil bordelais pour qu'on puisse partager de beaux moments et pour nos pauses téléphoniques.

Je remercie de tout mon cœur Annie et Jean, Florence et Emmanuelle, Karen et Christine, Thierry et Romain, pour m'avoir fait découvrir l'univers de la recherche et permis de sillonner un bout de chemin avec vous.

J'ai également une pensée toute particulière pour mes deux esperluettes, Leïla & Marie, à qui la distance ne fait pas peur et qui ont su garder un esprit alerte et une imagination sans limite. « Le vert est bien plus qu'une couleur, c'est un état d'esprit. ».

Je tiens à remercier « EndNote® » qui a su pimenter des situations banales sans suspens a priori, grâce à lui j'ai appris la patience et le contrôle de soi en toutes circonstances.

Merci Carole pour cette belle illustration de mon travail, une image vaut mille mots (sauf si comme moi, on n'a pas le don du dessin), grâce à toi je peux résumer ma thèse en un dessin.

Une petite pensée pour cette petite boule d'énergie qui est bien plus fiable qu'un réveil et qui répond, quand ça l'arrange, au doux nom d'Axolotl. Ensemble on a découvert l'Auvergne, la neige et les casse-croûtes rongeurs (sans tique s'il vous plaît).

The last but not the least....Je remercie l'ensemble de ma famille pour son soutien inébranlable et sa confiance en moi. Maman je ne te remercierai jamais assez d'avoir suivi de très près, et parfois un peu dans l'urgence, mes études sur les « coins-fecions ». Merci à toi Papa pour m'avoir aidée à créer un petit cocon douillet et pour nos discussions sur les tiques et toutes ces petites bêtes bien sympathiques. Merci à toi Félix pour tes visites impromptues toujours remplies d'aventures. Merci à toi Leïla pour m'avoir fait découvrir la glace au Saint Nectaire et d'avoir été « mon petit cerveau » quand le mien me faisait défaut. Et enfin Bonne Maman, je suis heureuse de t'avoir fait découvrir mon petit coin de paradis. Je suis très contente d'avoir partagé avec vous de beaux moments auvergnats, la suite au prochain épisode !

Sommaire

INTRODUCTION – LE MULTIPARASITISME	11
CHAPITRE 1 – LES ASSOCIATIONS ENTRE PARASITES : DES ENJEUX FONDAMENTAUX	17
<u>Article 1</u>	21
Vaumourin E., Vourc’h G., Gasqui P. & Vayssier-Taussat M. Causes and Consequences of multiparasitism: What tools for a better understanding? <i>In preparation</i>	
CHAPITRE 2 – IDENTIFICATION DES ASSOCIATIONS DE PARASITES	57
<u>Article 2</u>	61
Vaumourin E., Vourc’h G., Telfer S., Lambin X., Salih D.A., Seitzer U., Morand S., Charbonnel N., Vayssier-Taussat M. & Gasqui P. (2014) To Be or Not to Be Associated: Power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. <i>Frontiers in Cellular and Infection Microbiology</i> , 4:62	
<u>Autres Applications de la Méthode de Screening des Associations</u>	75
CHAPITRE 3 – CARACTERISATION DES INTERACTIONS BIOLOGIQUES ENTRE PARASITES	79
<u>Article 3</u>	83
Vaumourin E., Gasqui P., Buffet J.P., Chapuis J.L., Pisanu B., Ferquel E., Vayssier-Taussat M. & Vourc’h G. (2013) A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations. <i>PloS one</i> , 8:6, e66167	
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	95
1. Stratégies pour analyser simultanément plus de 10 parasites	97
2. Les facteurs de risque communs : une source d’homogénéité et d’hétérogénéité, un défi méthodologique	100
3. L’étude des cas de non-indépendance entre les individus hôtes : l’exemple de la contagion	101
4. La prise en compte de l’aspect dynamique des infections	102
5. La sensibilité et la spécificité des méthodes de détection des parasites	103
6. Utilisations concrètes de nos connaissances sur le multiparasitisme pour gérer au mieux les parasites	104

ANNEXES	107
Annexe 1 – Ma Thèse en 180 secondes	109
Annexe 2 – Programme R de la fonction pour appliquer l’approche de screening des associations	111
Annexe 3 – Procédure d’utilisation sous R de la fonction pour appliquer l’approche de screening des associations	113
Annexe 4 – Programme R de la fonction pour appliquer l’approche du chi-deux généralisé	115
Annexe 5 – Programme R de la fonction pour appliquer l’approche du GLM multinomial	117
Annexe 6 – Programme R de la fonction pour appliquer les approches de réseaux de parasites et de combinaisons	119
Annexe 7 – Présentation d’une partie des résultats du Métaprogramme INRA MEM (projet Patho-Id)	121
Annexe 8 – Article de vulgarisation scientifique pour la région Auvergne	123
Annexe 9 – Les Faits Marquants 2013 de l’INRA en 120 secondes	125
Annexe 10 – Programme R des fonctions pour estimer les probabilités du modèle	127
Annexe 11 – Procédure d’utilisation sous R des fonctions pour estimer les probabilités du modèle	129
Annexe 12 – Article sur la coinfection de <i>Borrelia</i> et <i>Bartonella</i>	131
GLOSSAIRE	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	147

Introduction

LE MULTIPARASITISME



« *Le parasitisme concerne tous les êtres vivants, soit en tant qu'hôtes, soit en tant que parasites.* » *Peter W. Price*

Les co-occurrences de parasites d'importance médicale ont été maintes fois observées, essentiellement à l'occasion des études sur la compréhension des mécanismes qui interviennent dans le lien hôte – parasite. Des progrès indéniables, sur la connaissance de la dynamique de transmission des parasites d'importance médicale, ont été atteints grâce au développement de modèles épidémiologiques qui concernent un parasite infectant une espèce d'hôte (Anderson & May 1991). Or la réalité semble être plus complexe et impliquer des réseaux de liens entre et au sein de différents parasites et hôtes. Le dogme « un parasite – un hôte » est aujourd'hui remis en question. Le défi, illustré en partie par la **Figure 1**, est à présent de comprendre la dynamique des systèmes épidémiologiques qui impliquent plusieurs espèces d'hôtes et/ou plusieurs espèces de parasites (Woolhouse 2001, Holt *et al.* 2003, Rutrecht & Brown 2008). En effet, tous les organismes vivants sont exposés à plusieurs agents pathogènes. Pour comprendre au mieux cette réalité, il est donc nécessaire d'avoir une vision, multiparasitaire et populationnelle, qui implique à la fois les hôtes, les parasites, les environnements et les vecteurs (Polley 2005). Le multiparasitisme est une réalité qui a été plus ou moins négligée, mais durant la dernière décennie cette réalité et ses conséquences ont été mises en exergue chez l'homme (Harms & Feldmeier 2002, Abu-Raddad *et al.* 2006, Boraschi *et al.* 2008, Adegnika & Kremsner 2012), les animaux sauvages et domestiques (Lello *et al.* 2004, Behnke 2008, Telfer *et al.* 2008, 2010) et aussi chez les plantes (Jesus Junior *et al.* 2014). Les nombreux agents pathogènes trouvés chez des tiques (Reis *et al.* 2011) ou chez des rongeurs (Telfer *et al.* 2010) en sont un exemple. Les co-occurrences nous intéressent particulièrement lorsqu'elles sont plus ou moins fréquentes qu'attendues au hasard, nous parlerons alors d'associations. Les co-occurrences peuvent résulter du hasard. Elles peuvent être aussi dues à de réelles interactions biologiques entre les parasites. Ces interactions peuvent être synergiques lorsque la présence d'un parasite favorise l'infection par d'autres parasites (Corbett *et al.* 2003). Les interactions peuvent aussi être antagonistes lorsque la présence d'un parasite inhibe l'infection par d'autres parasites (Moreira *et al.* 2009). Les co-occurrences de parasites peuvent également résulter de facteurs de risque communs qui créent des associations entre les parasites (*e.g.* répartition spatiale, traits d'histoire de vie), alors qu'il n'y a pas d'interactions biologiques entre eux.

L'objectif de ma thèse a été de modéliser les associations de parasites dans le but d'identifier ces associations et de les caractériser (**Annexe 1**).

Je me suis placée principalement dans le cas de données issues d'études transversales, c'est à dire avec un seul temps d'observation, car ce sont les données les plus aisées à obtenir et donc les plus fréquentes en épidémiologie.

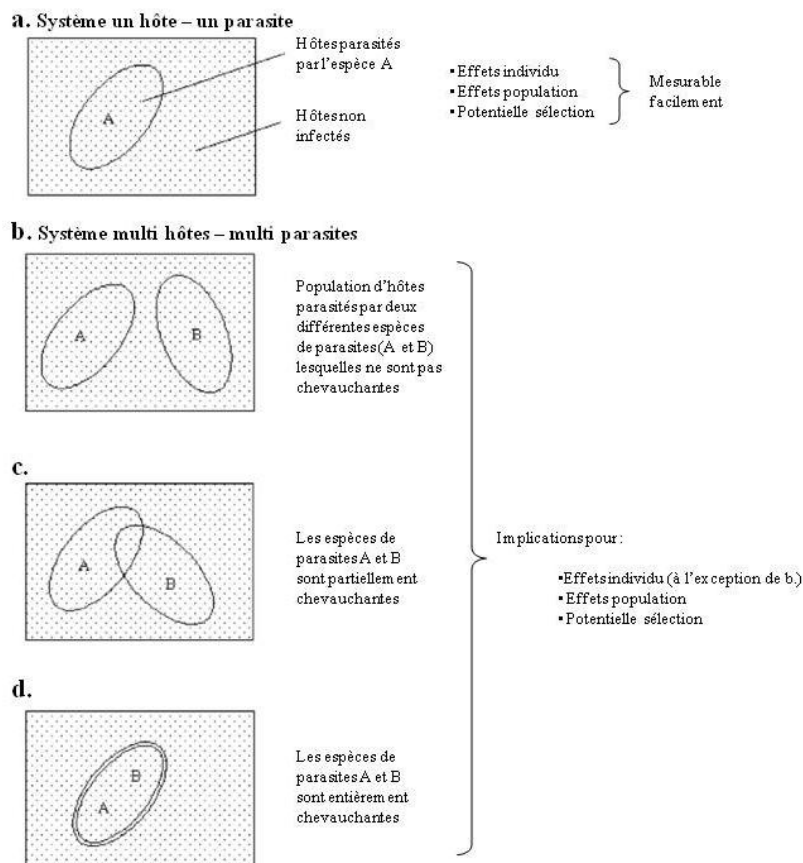


Figure 1 : Vue d'ensemble des structures possible des communautés de parasites. (a) Un système unique hôte – parasite ; (b-d) plusieurs systèmes hôte – parasite (avec deux espèces de parasites différentes) illustrant deux extrêmes (b) et (d) et une structure intermédiaire (c) (d'après Rutrecht & Brown 2008).

Pour atteindre mon objectif, j'ai débuté, dans le **Chapitre 1**, par une étude bibliographique sur les différentes causes et conséquences du multiparasitisme ainsi que sur les méthodes et outils disponibles pour étudier et comprendre les phénomènes qui génèrent le multiparasitisme chez les hôtes (**Article 1**).

J'ai poursuivi, dans le **Chapitre 2**, par la mise au point de méthodes permettant la détection des associations multiparasitaires. En effet, à l'ère de la génomique et de l'avènement de nouvelles technologies, comme le séquençage à haut débit, il est devenu possible d'identifier, dans les populations d'hôtes, des communautés entières de parasites ou pathobiomes (Cheval *et al.* 2011, Vayssier-Taussat *et al.* 2014). Être capable d'identifier statistiquement les parasites qui sont préférentiellement associés, est un atout considérable pour accélérer les recherches concernant les potentiels mécanismes d'interactions entre ces parasites. Nous avons développé une nouvelle approche – « de screening des associations » –

pour tester statistiquement la présence d'associations multiparasitaires à une échelle globale. Nous avons ensuite utilisé cette méthode pour identifier les associations et pour révéler précisément les parasites associés au sein de diverses populations d'hôtes (**Article 2** et **Annexes 2, 3, 4, 5, 6 et 7**).

Dans le **Chapitre 3**, j'ai modélisé un cas d'interactions biologiques entre deux parasites. Les interactions entre parasites sont souvent considérées comme des interactions deux à deux, où l'infection par un parasite influence l'acquisition et la dynamique d'infection d'un deuxième parasite. J'ai développé un modèle de détection des interactions pour identifier des interactions entre deux parasites vectorisés et persistants chez un hôte. Ce modèle permet de tester si les prévalences de coinfections observées sont significativement différentes de celles attendues sous l'hypothèse d'associations dues au hasard (**Article 3** et **Annexes 8, 9, 10 et 11**).

Enfin, dans la partie **Discussion générale et Perspectives**, je discute des avancées que ma thèse a permis d'effectuer concernant le développement de méthodes de détection et de caractérisation des associations et des interactions multiparasitaires, ainsi que des perspectives de recherche envisageables suite à ce travail.

Chapitre 1

LES ASSOCIATIONS ENTRE PARASITES : DES ENJEUX FONDAMENTAUX

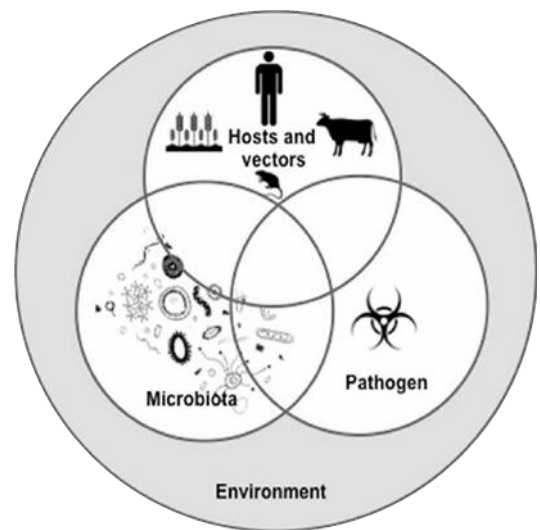


Figure adaptée de Vayssier-Taussat, M. *et al.* 2014 Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 29.

Dans ce chapitre nous définissons les différentes origines du multiparasitisme, c'est-à-dire l'infection d'un hôte par plusieurs parasites (**Article 1**). Le multiparasitisme est maintenant reconnu comme étant une réalité très fréquente (Keesing *et al.* 2010). Son importance est d'autant plus grande que cela concerne des parasites d'importance médicale, vétérinaire ou agronomique majeure.

Nous présentons les méthodes et outils disponibles pour étudier et comprendre au mieux les phénomènes qui génèrent le multiparasitisme chez les hôtes. En effet, pour étudier et comprendre, dans sa globalité le multiparasitisme, de multiples méthodes sont nécessaires. La variété des échelles nécessite d'avoir plusieurs points de vue pour démêler les causes des conséquences et les conséquences des causes du multiparasitisme. Les origines des observations des co-occurrences varient. Elles peuvent être effectuées dans les systèmes naturels ou en milieux contrôlés. Chacune de ces sources de données possède des avantages et des contraintes particulières. Le choix de l'une ou l'autre dépend avant tout des questions de recherches posées. Les données récoltées peuvent être ensuite analysées. Il existe deux grandes catégories d'approches de modélisation : les modèles exploratoires, permettant de réaliser une première approche rapide des systèmes étudiés, et les modèles mécanistes, permettant d'étudier plus en détail les interactions entre parasites.

Enfin, nous verrons que la présence simultanée de plusieurs parasites, et les interactions qui peuvent en découler, ont une grande influence sur la dynamique et la structuration des populations de parasites concernés mais aussi sur celles de leurs hôtes (Petney & Andrews 1998, Wood *et al.* 2007). Il en résulte des modifications de paramètres clés en médecine et en épidémiologie, tels que les symptômes, la durée d'infection, la probabilité d'infection, la probabilité de transmission et la virulence des parasites (Ezenwa & Jolles 2011, Tompkins *et al.* 2011). Les conséquences du multiparasitisme ne résultent pas de la somme des effets des mono-infections, mais plus de la combinaison d'effets connus et nouveaux dans une dynamique incluant les parasites et les hôtes (*e.g.* Courchamp *et al.* 1997, Malakar *et al.* 1999, Fonseca *et al.* 2005, Herrmann *et al.* 2013). Il est important de prendre en compte ces conséquences si on veut avoir des mesures de contrôle et de prévention des maladies infectieuses adaptées.

Article 1

Vaumourin E., Vourc'h G., Gasqui P. & Vayssier-Taussat M. Causes and Consequences of multiparasitism: What tools for a better understanding? *In preparation*

Causes and Consequences of multiparasitism: What tools for a better understanding?

Vaumourin E.^{1,2*}, Vourc'h G.¹, Gasqui P.¹ & Vayssier-Taussat M.²

¹UR346 Epidémiologie Animale, INRA, Saint Genès Champanelle, France

²USC BIPAR, INRA-ANSES-ENVA, Maisons-Alfort, France

* Correspondence : elise.vaumourin@yahoo.fr

Résumé

Le multiparasitisme, et surtout les associations qui en découlent, ont une grande influence sur la dynamique des parasites concernés mais aussi sur celle de leurs hôtes. Or ces parasites sont pour la plupart d'une importance médicale, vétérinaire ou agronomique majeure. L'objectif de cette revue est de faire le point sur les connaissances concernant les causes et conséquences du multiparasitisme ainsi que de présenter les différents méthodes et outils disponibles pour étudier et comprendre les phénomènes qui génèrent le multiparasitisme chez les hôtes. Les interactions entre parasites font intervenir des mécanismes bien particuliers qui leur permettent d'infecter les hôtes (*e.g.* facilitations mécaniques, compétitions directes ou indirectes, échappement du système immunitaire). Pour étudier et comprendre le multiparasitisme de multiples méthodes sont nécessaires. L'origine des observations des co-occurrences varie. Elles peuvent être effectuées dans les systèmes naturels ou en milieux contrôlés. Le choix de l'une ou l'autre dépend, avant tout, des questions de recherches posées. Les données récoltées peuvent être ensuite analysées *via* deux grandes catégories d'approches de modélisation : les modèles exploratoires, permettant de réaliser une première approche rapide du système étudié, et les modèles mécanistes, permettant d'étudier de façon plus détaillée les interactions entre parasites. Les conséquences du multiparasitisme ne résultent pas de la somme des effets des mono-infections, mais plus de la combinaison d'effets connus et nouveaux, sur des paramètres clés en épidémiologie. Il est important de prendre en compte ces conséquences si on veut avoir des mesures adaptées de contrôle et prévention des maladies infectieuses.

Mots-clés : Multiparasitisme, Interactions, Associations, Mécanismes, Observations, Modélisation.

Introduction

Plus de 80% des espèces connues, réparties sur de très nombreux taxa, sont considérées comme des parasites, *i.e.* entités biologiques vivant au dépend de leurs hôtes (Windsor 2000). Les parasites sont omniprésents dans le monde vivant, c'est en fait l'individu non parasité qui est l'exception. A l'image des portraits de Giuseppe Arcimboldo¹, il arrive que parfois on ne distingue plus l'hôte du parasite et *vice versa*. Par exemple, depuis peu, la microflore présente dans le tube digestif de l'homme est considérée comme un de ses organes à part entière (O'Hara & Shanahan 2006). Dans une autre mesure, l'ADN de rétrovirus endogènes comprend 1% du génome humain (Sverdlov 2000) et près de 40% du génome des mammifères est composé de rétro-transposons issus de rétrovirus (Tosta 2001, Kazazian 2004). Les parasites, au sens large, ne sont pas forcément pathogènes pour les hôtes qu'ils infectent et seule une petite minorité d'espèces ont un pouvoir pathogène qui peut s'exprimer suivant les conditions environnementales liées aux hôtes (Anderson & May 1979). Du fait de leur omniprésence, la plupart des parasites sont présents simultanément avec d'autres parasites. Donc plus que le parasitisme, c'est le polyparasitisme, ou multiparasitisme, qui est la règle (Thumbi *et al.* 2014). En plus d'être un groupe omniprésent, les parasites régulent un grand nombre de populations d'hôtes, dans divers écosystèmes, et sont une importante source de biodiversité (Summers *et al.* 2003, Hudson *et al.* 2006). Cette réalité est de plus en plus reconnue pour ce qui concerne les parasites d'importance médicale (Pedersen & Fenton 2007). Chez l'homme, plus de 1400 espèces de parasites, incluant virus, bactéries, helminthes, protozoaires et champignons, ont été recensées (Taylor *et al.* 2001). Les prévalences des infections multiples peuvent régulièrement atteindre 30%, voire 80% dans certaines populations humaines (Petney & Andrews 1998). Le multiparasitisme est une réalité qui a été plus ou moins négligée, mais depuis peu elle est mise en exergue chez l'homme (Harms & Feldmeier 2002, Abu-Raddad *et al.* 2006, Boraschi *et al.* 2008, Adegnika & Kremsner 2012), les animaux sauvages et domestiques (Lello *et al.* 2004, Behnke 2008, Telfer *et al.* 2008, 2010) et aussi chez les plantes (Jesus Junior *et al.* 2014).

Ainsi chaque être vivant semble être plus un consortium d'êtres vivants qui compose avec l'environnement, tel un système adaptatif (Tosta 2001, Vannier-Santos & Lenzi 2011, Daskin & Alford 2012). La vision d'interrelations entre parasites au sein d'organismes, en considérant ou pas l'environnement composé de microorganismes, est de plus en plus mise en avant.

¹ Giuseppe Arcimboldo, Arcimboldi ou Arcimboldus (1527 - 1593), peintre italien célèbre comme auteur de nombreux portraits suggérés par des végétaux, des animaux ou des objets astucieusement disposés.

En effet, en analogie avec le concept écologique de « biocénose² », plusieurs auteurs abordent ces systèmes adaptatifs concernant les parasites d'importance médicale, comme étant des pathocénoses (Grmek 1969), pathobiomes (Vayssier-Taussat *et al.* 2014), pathosystèmes (Okmen & Doehlemann 2014), microbiomes (Keesing *et al.* 2010), viromes (Bosch *et al.* 2013) ou résistomes (Dantas & Sommer 2012), suivant l'accent mis sur l'environnement, l'échelle et la pathogénicité.

Il est très important de connaître l'origine des co-occurrences car elle va modifier les conséquences médicales, agronomiques et vétérinaires. De là, les actions de prévention, de contrôle et les traitements pourront être adaptés.

La co-occurrence de parasites peut refléter une présence, détectée par hasard, de parasites indépendants au sein d'hôtes. Toutefois, ce qui est particulièrement intéressant c'est lorsque cette co-occurrence a une autre origine. La co-occurrence (ou l'exclusion) de parasites peut résulter de phénomènes d'interactions entre parasites. Ces interactions sont cruciales en médecine, étant donné qu'elles peuvent altérer la susceptibilité de l'hôte, la durée d'infection, le risque de transmission et les symptômes. Les parasites peuvent interagir en synergie, c'est-à-dire que la présence de l'un favorise l'infection par un ou plusieurs parasites ultérieurs. Elles peuvent être aussi bien inter-qu'intra-espèces. Par exemple, le risque de transmettre la maladie de Chagas (causée par *Trypanosoma cruzi*) est accru si le malade est aussi infecté par des helminthes, *e.g.* *Tenia solium* pour l'homme (Perez *et al.* 2014). Les interactions entre différentes souches de *Trypanosoma cruzi* peuvent modifier leur virulence et leur tropisme tissulaire chez le rat (Franco *et al.* 2003). En agronomie, nous pouvons citer l'exemple d'une interaction synergique entre deux virus du maïs, le virus de la mosaïque nanisante du maïs (MDMV) et le virus de la marbrure chlorotique du maïs ou MCMV (Jesus Junior *et al.* 2014). Cette interaction entre ces deux virus a pour conséquence de réduire de façon non négligeable la productivité des plants de maïs. Les parasites peuvent également interagir de manière antagoniste, c'est-à-dire que la présence de l'un inhibe l'infection par un ou plusieurs parasites ultérieurs. Par exemple, chez l'homme une multi-infection par le virus de l'hépatite G (VGB-C) et le VIH (ou Virus de l'Immunodéficience Humaine) conduit à une réduction de la mortalité due au VIH, par inhibition de sa réplication (Heringlake *et al.* 1998, Tillmann *et al.* 2001). Les interactions entre parasites sont souvent considérées comme des interactions deux à deux, où l'infection par un parasite influence l'acquisition et la dynamique d'infection d'un deuxième parasite. Ces interactions sont majoritairement conceptualisées par des réseaux d'interactions deux à deux tels que ceux étudiés en écologie (Rigaud *et al.* 2010, Bordes & Morand 2011). Cependant, les interactions au sein d'un ensemble de parasites sont plus probables. On peut imaginer des

² La biocénose est l'ensemble des êtres vivants qui occupent un milieu donné (le biotope), en interaction les uns avec les autres et avec ce milieu. La biocénose forme, avec son biotope, un écosystème.

interactions d'ordre supérieur entre 3, 4, 5 parasites, mais ce type d'interaction est complexe à conceptualiser. Les interactions multiples peuvent conduire à une variété d'effets possibles sur le pouvoir pathogène des parasites concernés (*e.g.* Kloepfer *et al.* 2014). Plus le nombre de parasites présents est grand, plus le nombre d'interactions possibles est grand (Petney & Andrews 1998). Les interactions peuvent alors influencer grandement la dynamique des parasites.

La co-occurrence de parasites peut aussi résulter de facteurs de risque communs qui créent des associations statistiques entre les parasites, c'est à dire qu'ils sont présents de façon plus ou moins fréquente qu'attendue, sans qu'il y ait pourtant de réelles interactions biologiques entre eux. Par exemple, les similarités de l'environnement, la densité d'hôtes, le climat, le comportement ou la susceptibilité physiologique peuvent être des causes de corrélations du risque d'infection entre deux parasites (Petney & Andrews 1998, Lloyd-Smith *et al.* 2005, Ezenwa & Jolles 2011, Lello *et al.* 2013). Ainsi, dans certains contextes les associations, chez l'homme, entre l'agent de la malaria et les helminthes peuvent être dues à des facteurs sociaux et environnementaux communs (*e.g.* niveau d'éducation, conditions sanitaires, présence d'eau près des maisons), plus qu'à de réelles interactions biologiques. Dans les études sur les populations hôtes, les interactions entre deux parasites sont suspectées quand la probabilité des coinfections diffère de celle attendue par hasard, une fois les facteurs de risque communs pris en compte. Or la prise en compte des facteurs de risque communs reste à l'heure actuelle un défi méthodologique de par leur complexité. De simples études de corrélations ne permettent pas de déterminer si des changements dans les communautés microbiennes sont la cause ou la conséquence des infections (Holzman *et al.* 2001, Atashili *et al.* 2008, Chang *et al.* 2008, Sunagawa *et al.* 2009, Keesing *et al.* 2010).

Plus que les associations ce sont les interactions qui jouent un rôle majeur dans la structuration des populations hôtes mais aussi celles de parasites, au niveau inter- et intra-hôtes. Cependant, il reste de nombreux défis méthodologiques pour les identifier. Les premières études sur les interactions étaient essentiellement expérimentales (Christensen *et al.* 1987, Behnke *et al.* 2001, Thomas *et al.* 2003, Ferrari *et al.* 2009). Cependant, les expérimentations en laboratoire ou les modèles développés *in silico* ne sont pas forcément le reflet exact de la complexe réalité (Lello *et al.* 2004, Fenton *et al.* 2014). Il est donc important mais difficile de confronter les données obtenues à la réalité, où de nombreux facteurs nous sont encore inconnus (Fenton & Perkins 2010, Telfer *et al.* 2010).

Après 30 années de travaux qui ont abordé le multiparasitisme, l'objectif de cette revue est de faire le point sur les connaissances concernant les causes et conséquences du multiparasitisme ainsi que de présenter les différents méthodes et outils que les chercheurs ont mis au point et utilisent pour étudier et comprendre les phénomènes qui génèrent le multiparasitisme et d'identifier les nouvelles

voies de recherches. Pour cela, nous allons dans un premier temps aborder les différentes causes étant à l'origine de multi-infections chez les individus hôtes. Puis nous verrons les méthodes et outils disponibles pour étudier et comprendre le multiparasitisme. Enfin, nous détaillerons les différentes conséquences épidémiologiques, médicales et agronomiques du multiparasitisme.

I. Pourquoi et comment les individus hôtes peuvent être multi-infectés ?

(La multi-infection a des origines imbriquées telles des Poupées Russes)

1. Les caractéristiques des hôtes qui favorisent les multi-infections

(L'hôte, le lieu de rendez-vous des malfaiteurs)

La co-occurrence de parasites, chez un hôte, peut résulter de facteurs de risque communs qui créent des associations statistiques entre la présence de parasites chez les hôtes, sans qu'il y ait pourtant de réelles interactions biologiques. Les parasites peuvent être associés écologiquement *via* différents facteurs communs d'exposition des hôtes, dont le principal facteur est lié à leur répartition spatiale, ou *via* des facteurs intrinsèques aux hôtes, dont notamment les facteurs liés à leurs traits d'histoire de vie.

A. Associations de parasites dues à la répartition et à l'utilisation de l'espace par les hôtes

L'environnement spatial dans lequel se trouvent les parasites et les hôtes est un élément crucial pour leur rencontre (Cox 2001). Selon leurs aires de distributions les hôtes seront plus ou moins exposés à une grande diversité de parasites. Par exemple, du fait de la diversité importante des parasites en zone tropicale (voir **Figure 2**), un hôte vivant en zone tropicale a plus de risque d'être infecté par plusieurs parasites (*e.g.* filariose, onchocercose, schistosomiase, trypanosomiase ou leishmaniose, Hotez *et al.* 2007) qu'un hôte vivant dans les zones tempérées. Plus la distribution de l'hôte est large, plus le risque de co-occurrences entre parasites est élevé. Un hôte a également plus de risque d'être coinfecté s'il utilise une niche écologique dans laquelle sont présents plusieurs parasites. Ainsi les hôtes généralistes, qui sont en mesure de vivre dans un grand nombre de conditions environnementales et qui utilisent une grande variété de ressources, s'exposent à une plus grande diversité de parasites. Par exemple, les rats, de par leur caractère ubiquiste, mettent en relation plusieurs environnements et donc plusieurs parasites (Taylor 1964). Leur charge parasitaire étant alors plus importante, ils sont décrits comme étant de bons vaisseaux ou « good vessels » de parasites (Smith & Carpenter 2006, Klimpel *et al.* 2007). On observe également ce phénomène

d'accumulation de parasites, chez les animaux territoriaux. Les comportements de défense de territoire, amenant les individus, essentiellement des mâles, à parcourir de nombreux kilomètres, augmentant ainsi fortement leur risque d'être exposés à plusieurs parasites et donc d'être coinfestés (Ezenwa 2004). A l'opposé, les hôtes spécialistes sont moins exposés étant donné qu'ils vivent et utilisent une gamme étroite de conditions environnementales et d'alimentation.

Les hôtes sont de plus en plus exposés à de multiples parasites du fait qu'à l'heure actuelle, les distances se réduisent de par les progrès dans les transports (avion, bateau) et les effets de la mondialisation (intensification de la circulation des hommes et des marchandises). C'est donc un facteur très important à considérer.

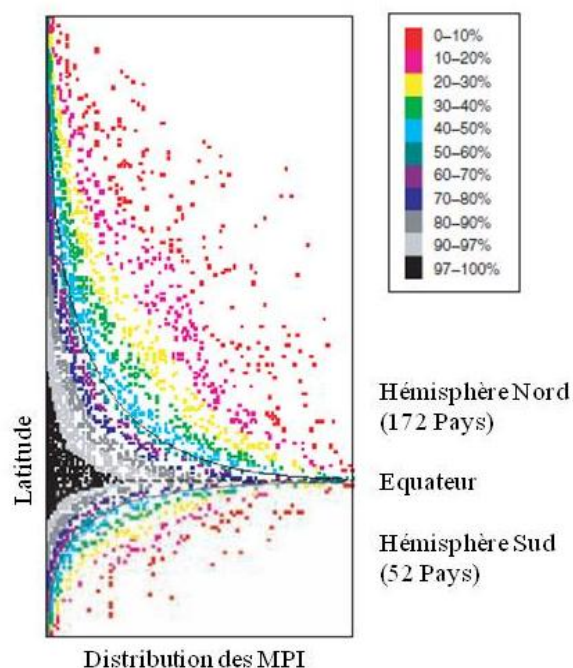


Figure 2 : Evolution de la richesse spécifique en maladies parasitaires et infectieuses (MPI) humaines selon la latitude. Représentation de la matrice de distribution de présence / absence pour les 229 espèces de MPI distinctes à travers les deux hémisphères. La matrice de présence / absence fournit des informations sur la distribution de la présence d'une espèce dans un lieu donné (noté par un point). La distribution est non-symétrique en raison de la répartition inégale des 224 pays étudiés (172 pays de l'hémisphère Nord contre seulement 52 pour l'hémisphère Sud). Le graphique met en évidence que la diversité des espèces MPI diminue à mesure que l'on se déplace vers le nord ou vers le sud de l'équateur. De plus, les MPI présentes dans une zone tempérée auront tendance à être également présentes dans les populations humaines des zones intertropicales. L'échelle de couleur indique la probabilité de rencontrer une espèce en fonction de sa position dans la matrice. La couleur noire représente la présence d'une espèce hautement prévisible, tandis que la couleur rouge indique la présence d'une espèce inattendue (d'après Guernier *et al.* 2004).

B. Associations de parasites dues aux traits d'histoire de vie des hôtes

Les facteurs de risque communs liés aux traits d'histoire de vie des hôtes sont des facteurs intrinsèques aux hôtes. Les traits d'histoire de vie des hôtes correspondent à la distribution des événements majeurs au cours de la vie d'un individu qui contribuent directement à la production et la

survie des descendants (Roff 1992, Stearns 1992, Thomas *et al.* 2012). Ils sont façonnés par la sélection naturelle donc en constante évolution. Il s'agit principalement du taux de croissance, de la longévité, de l'investissement parental, de la fécondité et de l'investissement immunitaire des hôtes. Les traits d'histoire de vie affectent la fitness des hôtes (*i.e.* leur capacité reproductrice et probabilité de survie). Une relation forte existe entre environnement et traits d'histoire de vie, impliquant notamment des compromis ou « trade-off » entre, par exemple, croissance et reproduction.

Les traits d'histoire de vie, suivant les conditions environnementales, impactent plus ou moins la condition physiologique des hôtes, les rendant par exemple stressés ou sous-nutris et donc plus ou moins permissifs aux parasites. Par exemple, dans les populations de souris (*Peromyscus leucopus* et *Peromyscus maniculatus*) le stress combiné, de la limitation de la nourriture et de l'infection de parasites intestinaux, impacte négativement leur survie hivernale et leur reproduction (Pedersen & Greives 2008).

L'investissement parental des hôtes peut impacter le multiparasitisme. Par exemple, l'investissement paternel permet de réduire les prévalences des parasites chez les mésanges (Richner *et al.* 1995). La durée de vie a également un effet sur le multiparasitisme, un hôte avec une longue longévité sera amené à accumuler plus de parasites qu'un hôte ayant une espérance de vie courte (Dobson & Roberts 1994).

Le comportement social des hôtes a également une grande influence sur le multiparasitisme. Ainsi des hôtes vivant en groupes, comme par exemple les chauves-souris, les humains ou les manchots favorisent les échanges de parasites étant donné que les individus hôtes ont plus de chances d'être fréquemment en contact. Contrairement aux individus solitaires, comme les martinets qui lors de leur migration sont peu exposés à de multiples parasites.

La proportion de l'investissement immunitaire des hôtes mène à une variation de leurs caractéristiques comme la résistance ou la tolérance face aux parasites. Par exemple, certaines espèces d'hôtes maintiennent un haut niveau de défenses immunitaires pour contrôler ou limiter les multiples infections de parasites, ils mettent ainsi en place des phénomènes de résistance (Råberg *et al.* 2007, 2009). Acquérir une résistance contre les vecteurs (*e.g.* tiques, puces, moustiques) peut permettre de limiter les multi-infections par les agents pathogènes qu'ils transportent, ainsi que leurs conséquences sur la fitness des hôtes (Wikel 1996, Wikel & Bergman 1997, Brossard & Wikel 2004). Inversement, d'autres espèces d'hôtes sont plutôt enclines à tolérer les infections multiples. La tolérance étant la capacité de maintenir sa fitness en présence d'une charge parasitaire donnée sans la réduire (Råberg *et al.* 2007, 2009). Des études ont mis en évidence que plus les individus hôtes étaient infectés par des espèces de parasites différentes, plus l'investissement immunitaire était important (Møller *et al.* 2001, Šimková *et al.* 2008, Bordes & Morand 2009, 2011). Toutefois, dans

certains cas, un compromis entre reproduction et immunité s'installe. Par exemple, les espèces introduites, comme le tamia, allouent en général plus de ressources à la survie et à la reproduction afin de coloniser rapidement, aux dépens de la protection immunitaire (Prenter *et al.* 2004). Ce compromis entre reproduction et immunité, est également observé chez les mâles. Afin d'augmenter leur pouvoir séducteur, certains mâles ont de forts taux de testostérone. Or cette hormone est immunodéprimante. Par exemple, chez les campagnols (*Myodes glareolus*), Hughes et Randolph (2001, 2009) ont montré que la testostérone affecte la résistance acquise contre la tique *Ixodes ricinus* et les agents pathogènes associés. L'immunodépression, induite par la testostérone, est alors une caractéristique qui favorise les multi-infections.

2. Les caractéristiques des parasites qui favorisent les multi-infections

(Le trousseau de clés des parasites – la complicité dans la multiplicité)

Les caractéristiques des parasites qui favorisent les multi-infections sont d'ordres généraux ou particuliers liés à différents mécanismes d'interactions.

A. Les caractéristiques générales

Tout comme les hôtes, selon leurs aires de distribution les parasites seront plus ou moins en contact avec une grande diversité d'autres parasites. Le cas d'*Ascaris lumbricoides* en est un exemple parfait, cette espèce infecte plus d'un quart de la population humaine (Booth *et al.* 1996), il est donc peu étonnant de le retrouver en association avec 47 autres espèces d'helminthes et de protozoaires (Crompton & Tulley 1987). Plus la distribution des parasites est large, plus le risque de co-occurrences entre des parasites, au sein d'un même hôte, est élevé. Les parasites ont également plus de risques d'être en contact s'ils utilisent des niches écologiques chevauchantes. Ainsi, les parasites généralistes, qui sont en mesure d'exploiter un grand nombre d'hôtes, ont plus de chances d'être en co-occurrence avec une grande diversité de parasites. A l'opposé, les parasites spécialistes, en exploitant une gamme étroite d'hôtes, ont moins de chances d'être en co-occurrence avec une grande diversité de parasites. Les relations phylogénétiques (*i.e.* le partage d'un ancêtre commun) entre les parasites peuvent influencer sur le partage de caractéristiques communes permettant ou limitant les multi-infections. Par exemple, les parasites phylogénétiquement proches ont plus de chances d'être adaptés et d'infecter les mêmes hôtes (individus ou espèces) (Barry & Turner 1991, Snounou & White 2004).

B. Les caractéristiques liées aux mécanismes d'infection

a. Mécanismes d'infection associés à l'entrée dans l'hôte

Les mécanismes d'infection associés à l'entrée dans l'hôte correspondent principalement aux facilitations mécaniques (Bandilla *et al.* 2006). Il s'agit de l'ouverture mécanique d'une voie dans l'hôte, *i.e.* franchissement des barrières physiques de l'hôte. Par exemple, des ectoparasites comme *Argulus coregoni* et *Flavobacterium columnare*, qui infectent simultanément la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), détruisent le mucus et l'épiderme des poissons. Cela provoque des ulcères et des nécroses qui pourront alors servir de portes d'entrée pour de potentielles invasions secondaires (Singhal *et al.* 1990, Bader *et al.* 2003, Bandilla *et al.* 2006). Certains endoparasites, quant à eux, entraînent des lésions de la muqueuse qui facilitent l'entrée d'autres parasites, comme c'est le cas pour le virus de l'herpès simplex de type 2 (VHS-2) et le virus du SIDA (VIH) (Cunningham *et al.* 1985, Koelle *et al.* 1994). Certains parasites inhibent même l'activité ciliaire des épithéliums, les rendant plus sensibles aux infections (Bakaletz 1995, Van de Perre *et al.* 2008).

b. Mécanismes d'infection associés à l'utilisation de la ressource hôte

Les mécanismes d'infection liés à l'utilisation de la ressource hôte par les parasites sont essentiellement des mécanismes de compétitions, directes ou indirectes (Patrick 1991, Petney & Andrews 1998, Vidal-Martínez & Kennedy 2000, Pedersen & Fenton 2007).

La compétition peut être spatiale, par exemple, entre deux espèces qui partagent la même localisation dans l'hôte (Holmes 1961, Patrick 1991, Friggens & Brown 2005, Stancampiano *et al.* 2010). Elle peut amener à la coexistence des parasites *via* une modification des niches écologiques des parasites concernés (Shorrock 1990, Haukialmi & Henttonen 1993). Par exemple, pour des helminthes, la localisation intra-hôte ou plus particulièrement le site d'attachement est différent selon les parasites présents (Bush & Holmes 1986, Patrick 1991, Ellis *et al.* 1999).

La compétition peut également impacter l'abondance des espèces (Dash 1981, Holland 1984, Sousa 1993, Frontera *et al.* 2005), la charge parasitaire (Lello *et al.* 2004), la transmission (Tortosa *et al.* 2008, Mousson *et al.* 2010, 2012) ou la virulence des parasites (Vautrin & Vavre 2009). La compétition peut être d'ordre moléculaire *via* la production, par certains parasites, de toxines (*e.g.* bactériocines, oxyde nitrique) qui peuvent réduire ou augmenter la croissance et la virulence de parasites co-présents (Riley *et al.* 2003, Massey *et al.* 2004, Bridier *et al.* 2014, Rajkovic 2014, Stacy *et al.* 2014). Par exemple, les bactéries *Enterobacter*, de la flore microbienne de l'intestin des

Anophèles rendent ces moustiques résistants aux infections d'un parasite d'une grande importance en santé humaine : *Plasmodium falciparum*, agent de la malaria (Cirimotich *et al.* 2011). En santé humaine, le virus à ARN *Leishmania* – 1 (« *Leishmania* RNA Virus – 1 » ou LRV1) promeut la persistance et la diffusion des parasites intracellulaires du sous-genre *Leishmania viannia*, causant de grave leishmanioses mucocutanées (Ives *et al.* 2011). En agronomie, les bactéries du genre *Buchnera*, jouent un rôle crucial dans la persistance du virus de l'enroulement de la pomme de terre (PLRV) dans l'hémolymphe des pucerons (*Myzus persicae*), la protéine clé dans cette interaction est probablement la symbionin (van den Heuvel *et al.* 1994).

La compétition entre deux parasites peut conduire un parasite à « saboter », si cela n'est pas dans son intérêt, le contrôle du comportement de l'hôte par un autre parasite, qui aboutit par exemple à l'augmentation de la prédation (Thomas *et al.* 2002, Haine *et al.* 2005).

La compétition peut aussi avoir un effet « barrière » (Casadevall & Pirofski 2000, Akira *et al.* 2006, Jones & Dangl 2006). Ce mécanisme a été décrit comme « l'effet Jameson » (Jameson 1962). Les parasites sont alors impactés par la réduction de la disponibilité de la ressource (Ishii *et al.* 2002). Par exemple, lors d'une anémie due à l'infection par des helminthes, ces derniers entrent en compétition avec les microparasites intraérythrocytaires, pour qui les globules rouges sont une ressource capitale (Graham 2008). La compétition peut également être un moteur d'évolution d'autant plus important dans le cas du multiparasitisme. En effet, la proximité d'une grande diversité de parasites au sein d'un hôte peut affecter la probabilité d'échanges de gènes, *via* par exemple des plasmides et des phénomènes de recombinaisons. Cela peut permettre aux parasites d'acquérir de nouvelles fonctions les rendant par exemple plus virulents ou résistants (*e.g.* transferts d'îlots de pathogénicité, résistances aux antibiotiques, Dantas & Sommer 2012, Forsberg *et al.* 2012, Perry & Wright 2013).

c. Mécanismes d'infection associés à la réponse de l'hôte

Chacun des parasites qui infecte un hôte doit pouvoir se maintenir malgré l'hôte et son système immunitaire, et notamment sa mémoire immunitaire. Cette mémoire immunitaire impacte fortement les probabilités de réinfections. Une infection (présente ou passée) par un parasite peut avoir d'importantes conséquences sur les infections ultérieures de parasites (Holmes 1961, Beldomenico & Begon 2010). Une telle situation met en lumière l'importance de l'ordre d'infection des hôtes surtout dans un contexte de multiparasitisme (Thomas *et al.* 2003, Lohr *et al.* 2010). Les interactions ont lieu par l'intermédiaire de molécules du système immunitaire de l'hôte, comme les anticorps, les

cytokines ou l'activation du complément (Cox 2001, Supali *et al.* 2010). Certains parasites ont mis en place des mécanismes d'échappement du système immunitaire.

La modulation du système immunitaire de l'hôte par les parasites peut avoir lieu au travers d'immunosuppression (*e.g.* suppression de certaines interleukines, lymphocytes). Ce phénomène a des conséquences sur les autres parasites, facilitant leur entrée dans l'hôte, ainsi que celle d'organismes habituellement non-pathogènes appelés alors « parasites opportunistes » (Karp *et al.* 1996, Stewart *et al.* 1999, Cox 2001, Su *et al.* 2005, Val *et al.* 2005, Su *et al.* 2006, Pedersen & Fenton 2007). Par exemple, les souris coinfectées par *Heligmosomoides polygyrus* (helminthe) et *Plasmodium chabaudi* produisent des niveaux significativement plus bas d'interféron gamma (IFN- γ), réponse immunitaire antipaludéenne, en comparaison à des souris infectées par l'agent du paludisme seul (Su *et al.* 2005, 2006). La modulation du système immunitaire de l'hôte par les parasites peut également être à l'origine d'augmentation de la production de certaines molécules (*e.g.* interleukines, anticorps), il s'agit alors d'immunoprotection. L'immunité développée contre un parasite peut également être efficace contre un organisme antigéniquement similaire. On évoque alors le terme d'immunité croisée (*i.e.* reconnaissance des deux antigènes par les mêmes anticorps et cellules T). Le degré d'immunité croisée dépend uniquement du degré de similarité antigénique des parasites, celui-ci n'est pas forcément lié à leur apparentement phylogénétique. Des effets protecteurs pour l'hôte, dus à ce phénomène d'immunité-croisée, ont été mis notamment en évidence entre des helminthes intestinaux dans une population de lapins. *Trichostrongylus retortaeformis* interagit négativement, *via* le système immunitaire de l'hôte, avec *Graphidium strigosum* (Lello *et al.* 2004).

Un autre phénomène mettant en jeu le système immunitaire de l'hôte existe. Il s'agit de la polarisation de la réponse immunitaire faisant intervenir un compromis entre deux réponses cellulaires du système immunitaire de l'hôte (*i.e.* Th1 – Th2), amenant à une dynamique différente lors d'une monoinfection ou d'une coinfection. Ce phénomène est donc une voie possible d'interactions dynamiques (Pedersen & Fenton 2007). La polarisation de la réponse immunitaire peut avoir des effets mutuellement bénéfiques pour les différents parasites mis en jeu mais néfastes pour l'hôte. Par exemple, lors d'une coinfection entre *Trypanosoma cruzi*, activant la voie Th1, et divers helminthes, activant la voie Th2 (Perez *et al.* 2014), le risque de transmettre *Trypanosoma cruzi* augmente étant donné un compromis immunitaire en sa faveur (Rodriguez *et al.* 1999, Tarleton *et al.* 2000, Galan-Puchades & Osuna 2012). Or il existe également des exemples d'interactions bénéfiques pour les hôtes mais néfastes pour les différents parasites concernés. Par exemple, chez un individu atteint du paludisme, qui est infecté par des helminthes, se met en place un compromis immunitaire pour contrôler les deux parasites. Cela entraîne une diminution de la réponse

immunitaire (Th1) dirigée contre *Plasmodium*. Ainsi le risque de neuro-paludisme diminue car cette complication serait due à une réponse Th1 excessive (Maizels *et al.* 2004, Nacher 2004).

II. Les méthodes pour étudier le multiparasitisme

(Des outils sur-mesure)

Pour étudier et comprendre dans sa globalité le multiparasitisme, phénomène complexe avec de multiples facettes, de multiples méthodes sont nécessaires. La variété des échelles amène la nécessité d'avoir plusieurs points de vue pour démêler les causes des conséquences et les conséquences des causes du multiparasitisme. Les méthodes pour étudier le multiparasitisme se basent en premier lieu sur des observations, qu'elles soient effectuées en milieux naturels ou en milieux contrôlés. Ces deux grandes sources d'informations sont complémentaires et les hypothèses ou résultats issus de chacune doivent nourrir la réflexion lors de la mise en pratique de l'autre (Poulin 2001). A partir de ces observations, différentes stratégies d'analyses statistiques sont possibles. Les observations peuvent être analysées soit *via* des modèles exploratoires, soit *via* des modèles mécanistes. Il est également possible d'étudier les propriétés de ces modèles *via* des modèles de simulations.

1. L'origine des observations du multiparasitisme

(Des sources multiples)

A. Les observations effectuées en milieux naturels

L'étude du multiparasitisme peut se baser sur des observations effectuées dans les systèmes naturels. Celles-ci peuvent être réalisées selon plusieurs types de protocoles.

L'un des principaux protocoles concerne les études longitudinales. Dans de telles études, les mêmes individus sont observés sur de longues périodes de temps. Cela nécessite de nombreuses contraintes, dont la principale est de reconnaître les individus étudiés. Cette reconnaissance peut se faire *via* des marquages spécifiques, comme dans le cadre des études de Capture Marquage Recapture ou CMR (*e.g.* Higgs & Nowell 2000, Brown & Brown 2004) ou *via* des appareils technologiques, telles que les balises Argos ou les puces GPS (*e.g.* Falzon *et al.* 2013). Ces systèmes de reconnaissance sont peu adaptés aux suivis d'animaux de petites tailles, comme par exemple les vecteurs arthropodes qui sont pourtant des hôtes de grande importance en épidémiologie. Dans les études longitudinales, la fitness de l'hôte ne doit pas être impactée par les prélèvements effectués, donc les seules sources d'informations envisageables sont celles issues de prélèvements peu ou pas

invasifs (*e.g.* des prélèvements de sang, de fèces, des biopsies cutanées limitées). Les données sur les agents infectieux sont donc, soit des preuves indirectes de présence (*e.g.* anticorps, ADN), soit des preuves directes de présence (*e.g.* œufs, isolement parasitaire). Dans ces études grâce à l'information temporelle, il est possible de tester si la présence d'un parasite impacte la probabilité d'infection (Sherlock *et al.* 2013), le maintien (Kosoy *et al.* 2004) et la transmission (Mahiane *et al.* 2010) d'un autre parasite. Toutefois, elles exigent beaucoup de ressources (humaine, monétaire et temps).

Les études transversales sont un autre des principaux protocoles d'observation. Dans de telles études, ce sont des individus différents qui sont observés sur de courtes périodes de temps. Donc contrairement aux études longitudinales, plus que des données individuelles ce sont des données populationnelles que nous obtenons *via* les études transversales. Dans ces études, l'impact, sur la fitness de l'hôte, des prélèvements effectués n'a que peu d'importance étant donné l'absence, en théorie, de suivi des individus. Les sources d'informations envisageables peuvent donc provenir de prélèvements plus ou moins invasifs. Cela permet, dans certains cas, d'effectuer des détectations de parasites dans divers organes internes. Ainsi, avec de telles études, en plus de la présence des parasites, il est également possible d'étudier leurs tropismes tissulaires (Triantos *et al.* 1998, Wang *et al.* 1999). Cependant, il est possible d'effectuer, *via* des études transversales, des observations qui reconstituent des séries chronologiques (Nolan & Smith 1995, Cattadori *et al.* 2005, Telfer *et al.* 2010). Il s'agit alors de suivre différents échantillons individus d'une même population, à différents temps *t*, afin d'avoir un suivi au cours du temps de cette population. Dans ces cas-là, la fitness des hôtes ne doit pas être impactée par les prélèvements effectués. Les études transversales sont moins chronophages et moins onéreuses que des études longitudinales. Elles peuvent concerner un grand nombre d'hôtes, cela sera utile pour avoir un bon pouvoir discriminant et des conclusions statistiquement robustes. Enfin, elles sont particulièrement utiles lorsque les objets d'études sont des espèces de parasites ou d'hôtes émergentes donc mal connues (Haukisalmi & Henttonen 1993, Mina *et al.* 2014, Wilkinson *et al.* 2014).

A chacun de ces protocoles correspond des avantages et des contraintes particuliers. Le choix de l'un ou l'autre dépend des questions de recherches posées en amont de l'étude.

B. Les observations effectuées en milieux expérimentaux

Les observations effectuées en milieux expérimentaux (*i.e.* contrôlés) permettent d'étudier l'impact du multiparasitisme et de mettre en avant les interactions antagonistes et synergiques entre divers parasites (*e.g.* helminthes, protozoaires, champignons, virus, acariens) chez différents hôtes : mammifères (Christensen *et al.* 1987, Behnke *et al.* 2001, Ferrari *et al.* 2009), insectes (Thomas *et*

al. 2003, Bonsall & Benmayor 2005) ou plantes (Buono *et al.* 2014). Tout comme les observations effectuées en milieux naturels, les observations effectuées en milieux contrôlés peuvent être réalisées selon les protocoles d'études longitudinales ou transversales. Les principaux intérêts, des observations effectuées en milieux expérimentaux, sont que les facteurs de risque communs, comme la condition des hôtes, et les facteurs d'infections, comme les prévalences des agents pathogènes, sont contrôlés et qu'il est possible d'étudier des paramètres variés, *e.g.* croissance, fécondité et durée de vie des hôtes, établissement des parasites. Les modèles biologiques étudiés expérimentalement peuvent également être variés, suivant les problématiques de recherches posées, il est envisageable de travailler aussi bien sur des organismes vivants que sur des tissus biologiques (Allan 2000, Allan 2004, Pawlowski *et al.* 2012). Ainsi, il est possible de vérifier la validité des hypothèses biologiques posées *a priori* ou établies *a posteriori* et d'étudier finement les mécanismes d'interactions (*e.g.* immunité croisée, activation de macrophages, résistance, tropisme) moins accessibles *via* les observations effectuées en milieux naturels (*e.g.* Kishida *et al.* 2004).

Cependant, les résultats des infections expérimentales sont à relativiser car ils diffèrent de ceux des infections naturelles (Roossinck 2011). Par exemple, l'injection d'un microorganisme avec une seringue ne peut pas être un modèle parfait mimant une transmission vectorielle (*e.g.* *via* les tiques, moustiques, puces), les interactions intra-hôte, ici avec le vecteur, ayant une grande influence sur les parasites. Par exemple, les tiques, et notamment les protéines contenues dans leur salive, jouent un rôle important sur le pouvoir infectieux des bactéries du genre *Borrelia* (Pechová *et al.* 2002, Mason *et al.* 2014). Cela limite de ce fait l'extrapolation hors du contexte du laboratoire. Toutefois, les données obtenues par ces études sont néanmoins utiles et peuvent permettre de confirmer ou d'infirmer les hypothèses soulevées lors des études effectuées dans les milieux naturels, orientant les recherches futures.

2. Les stratégies d'analyses statistiques

(Des stratégies d'enquêtes tout terrain)

Les modèles statistiques visant à décrire au mieux la réalité sont à la fois composés d'une partie déterministe et d'une partie stochastique. La partie déterministe concerne les effets dynamiques et mécanistes des facteurs étudiés. La partie stochastique permet de prendre en compte principalement la précision des mesures et d'éventuels biais d'échantillonnage (*e.g.* Bord *et al.* 2014). Elle permet également d'inclure des effets aléatoires sur des paramètres du modèle, notamment dans le cadre des modèles mixtes, afin de prendre en compte une éventuelle hétérogénéité des individus. Enfin, grâce à

cette partie stochastique, il est possible de tenir compte du fait que les phénomènes observés soient en partie aléatoires.

Ainsi, les observations, effectuées en milieux naturels ou contrôlés, du multiparasitisme peuvent être analysées *via* deux grandes catégories d'approches de modélisation : les modèles exploratoires et les modèles mécanistes.

A. Les modèles exploratoires

Les modèles exploratoires, empiriques ou descriptifs servent surtout à étudier la présence ou non d'associations. Les paramètres qui servent à leur construction n'ont en général pas de lien direct avec la biologie des modèles d'études. Ils sont construits pour identifier des corrélations et donc d'éventuelles associations, mais ne permettent pas de réellement conclure sur de possibles interactions. Ils correspondent à la mise en avant d'une première approche rapide du système étudié. Ces modèles ont tout de même deux avantages majeurs, ils sont d'utilisation simple et rapide et les données nécessaires à leur mise en œuvre peuvent être issues d'études transversales. Ils sont donc largement utilisés, et ce dans plusieurs domaines d'études et pas seulement en épidémiologie.

L'une des premières catégories de modèles exploratoires est celle qui regroupe les analyses factorielles, *e.g.* APC, FCA, DA, CoA (Gauch 1982). Celles-ci évaluent si les parasites ont tendance à se regrouper (*i.e.* identification des phénomènes de surdispersion). L'inconvénient est qu'il n'y a généralement pas de tests statistiques associés à ces analyses (mais voire par exemple les méthodes de permutation, Tollenaere *et al.* 2008, Salvador *et al.* 2011). Ceci est un inconvénient important car les tests statistiques permettent de déterminer si les observations se différencient ou non de l'hypothèse nulle, c'est à dire le fait que les parasites soient indépendants ou non associés.

Le test du chi-deux est le test le plus populaire et le plus facile à mettre en œuvre. Il est principalement utilisé pour étudier les relations présentes entre deux parasites, mais plusieurs adaptations ont été proposées pour étudier plusieurs parasites (Holm 1979, Benjamini & Hochberg 1995, Janovy *et al.* 1995) ou pour prendre en compte des facteurs de risque communs potentiellement associés aux parasites étudiés (*e.g.* Hellard *et al.* 2012). En outre, le test du chi-deux peut être généralisé en se basant sur la corrélation entre deux variables qualitatives, telle que décrite par Fahrmeir et Tutz (1994). Le principal inconvénient de cette approche est qu'un effectif de cinq individus hôtes au moins est nécessaire pour chaque état infectieux.

Les modèles linéaires généralisés (GLM) sont aussi largement utilisés. La régression logistique multinomiale doit être privilégiée pour les adapter au multiparasitisme (McCullagh & Nelder 1989,

Yee & Wild 1996, Agresti 2002). Ces approches peuvent explicitement tenir compte de facteurs de risque potentiels identifiés *a priori*.

Les méthodes de réseaux sont de plus en plus utilisées au cours de ces dernières années (Bascompte 2007). Ils offrent une représentation intéressante des multiples relations parasitaires (Godfrey 2013, Poisot *et al.* 2013, Griffiths *et al.* 2014). Ils fournissent des indices d'association tels que la connectance (Yodzis 1980), le « nestedness » (Bascompte *et al.* 2003) ou la « betweenness » (Freeman 1977). Lorsqu'on étudie moins de 10 parasites, les résultats issus de la projection des parasites sont non-informatifs (Csardi & Nepusz 2006). Cependant, quand il y a plus de 10 parasites dans le jeu de données étudié, les conclusions obtenues ont un sens biologique. Or à ce jour, les tests statistiques sur les indices d'association liés aux réseaux sont peu développés.

La méthode de screening des associations est une approche basée sur un raisonnement dit « en combinaisons » de parasites (Vaumourin *et al.* 2014), qui a l'avantage, par rapport aux autres, de détecter et de tester si, statistiquement, les parasites sont en association. C'est un prérequis important pour des recherches plus précises se concentrant sur les mécanismes à l'origine des interactions potentiellement identifiées, *via* par exemple des modèles mécanistes (*e.g.* Sherlock *et al.* 2013, Vaumourin *et al.* 2013). Cependant, le nombre de parasites étudiés est très vite limitant dans cette approche étant donné que le nombre de combinaisons de parasites augmente de façon exponentielle (*i.e.* le nombre de combinaisons est égal à 2 puissance le nombre de parasites). Ainsi, le nombre maximum de parasites qu'il est raisonnablement possible d'étudier simultanément dépend avant tout de la taille de l'échantillon des individus hôtes étudié, compte tenu des prévalences des différents parasites détectés.

B. Les modèles mécanistes

Les modèles mécanistes ou explicatifs, tels que les modèles à bases déterministes ou les modèles probabilistes ont vocation à étudier plus finement les mécanismes d'associations entre parasites et donc à se concentrer sur les interactions potentielles. Les modèles mécanistes permettent d'étudier de nombreuses problématiques associées au multiparasitisme, comme par exemple les conséquences des coinfections microparasites – macroparasites (Fenton 2008), l'évolution de la virulence (Alizon & van Baalen 2008), la dynamique de transmission (Merler *et al.* 2008), l'influence des traits d'histoire de vie de hôte (Zhang *et al.* 2007) ou l'impact de l'immunité croisée sur les parasites co-présents (Gokaydin *et al.* 2007). Ils sont en général plus complexes et fortement dépendants de la problématique de l'étude. En effet, les paramètres qui servent à la construction des modèles explicatifs ont un sens biologique direct étant donné que ces méthodes sont plus spécifiques que les

approches exploratoires, *i.e.* nécessité d'*a priori* sur l'écologie des parasites et des hôtes étudiés. Ils sont également plus puissants et donc ils apportent plus d'informations sur les processus étudiés. Cependant, cette spécificité en fait des modèles plus ou moins uniques.

Les modèles à bases déterministes définis par des compartiments, comme les modèles de type SIR (Sensible – Infecté – Rétabli), constituent la base de nombreux modèles épidémiologiques et se construisent essentiellement à partir de données issues d'études longitudinales (Griffin & Nunn 2011). Plus généralement on les nomme les « Multi-State Models ou MSM », *i.e.* modèles aux multiples états (Andersen *et al.* 1993, Commenges 1999, Hougaard 1999). La prise en compte du temps permet d'étudier l'évolution des flux entre les différents compartiments, qu'on soit dans l'état transitoire ou stationnaire du processus étudié. Ainsi, il est possible de tester, par exemple, si la présence d'un parasite impacte la probabilité d'infection, potentiellement aussi le maintien et la transmission, d'un autre parasite (Tanaka & Feldman 1999). La façon dont ils sont construits permet également de tester différentes hypothèses biologiques, telles que l'impact des infections multiples sur les phénomènes de résistances, l'influence de l'âge et des effectifs des hôtes (*i.e.* démographie). Toutefois, ces modèles sont complexes car ils requièrent beaucoup de paramètres. Ils sont donc souvent accompagnés de simulations ou alors d'estimations issues des données de la littérature (Choisy *et al.* 2007, 2010). Si on a des *a priori* sur les paramètres, l'utilisation d'approches bayésiennes peut être un atout dans l'estimation de ces paramètres (Clark & Hersh 2009, Schur *et al.* 2011). Quelques modèles à bases déterministes ont été développés pour étudier des problématiques liées au multiparasitisme. Par exemple, Zhang *et al.* (2007) ont construit un modèle de type SIR spécifique aux hypothèses qu'ils établissent sur les paramètres qu'ils utilisent (*i.e.* la densité de parasites, le nombre d'hôtes infectés, le taux d'infection et de reproduction des parasites, l'ordre des infections, la susceptibilité des hôtes). Ils ont ainsi créé un modèle à quatre catégories épidémiologiques : les hôtes non infectés (S), les hôtes monoinfectés par l'un ou l'autre des parasites (I_1 ou I_2) et les hôtes coinfectés par les deux parasites (I_{12}), avec un paramètre P_i qui désigne la densité des parasites i . Celui-ci leur a permis d'évaluer comment les interactions entre parasites peuvent influencer sur leur établissement et leur persistance respectives. Les auteurs ont mis en évidence que la coinfection entre deux parasites, dans une population d'hôtes, n'est possible que s'ils ont un R_0 (*i.e.* taux de reproduction de base) faible. Leurs résultats ont mis en évidence que les traits d'histoire de vie des hôtes combinés aux coinfections peuvent influencer sur l'évolution, de chaque parasite concerné, vers des stratégies généralistes ou spécialistes. Un autre modèle a été développé en prenant en compte la mémoire immunitaire durable induite par un parasite. Gokaydin *et al.* (2007) ont modélisé la dynamique de transmission des sous-types du virus influenza de type A à l'aide d'un modèle de type SIRI (Sensible – Infecté – Rétabli – Infecté), où la réinfection se produit à un taux

réduit en raison d'une immunité partielle entre les sous-types. Les auteurs mettent en avant que le seuil de réinfection (ou RT) a un rôle important de régulateur de la diversité des agents pathogènes. Cette diversité induit une augmentation des niveaux d'infection dans la population et provoque une diminution de l'efficacité des programmes de vaccination.

Tout comme les modèles à bases déterministes, les modèles probabilistes se basent sur des hypothèses biologiques explicites et précises, permettant aussi d'estimer les paramètres et de tester différents jeux d'hypothèses biologiques. Cependant, contrairement aux modèles à bases déterministes, les modèles probabilistes ne prennent que très peu en compte le temps, ils se placent alors dans le cadre de l'état stationnaire du processus étudié. L'intérêt principal de ces modèles est qu'ils sont centrés sur les états des individus d'une population et leur probabilité de passage d'un état à l'autre. Les paramètres utilisés dans les modèles probabilistes sont mesurables sur le terrain, comme par exemple les probabilités d'infections de chaque parasite dans la population étudiée (Vaumourin *et al.* 2013). La variété des modèles probabilistes est toute aussi grande que celle des modèles à bases déterministes, étant donné qu'ils sont spécifiques aux hypothèses biologiques posées *a priori*. Les modèles probabilistes peuvent par exemple utiliser des chaînes de Markov (*e.g.* Mahiane *et al.* 2010, Sherlock *et al.* 2013) ou diverses lois de probabilités (*e.g.* binomiale, multinomiale).

C. Les modèles de simulations

Les modèles de simulations utilisent des données fictives créées dans le but d'étudier les propriétés des modèles exploratoires et mécanistes, *i.e.* sensibilité et puissance (Brown & Rothery 1993, McCallum 2008, Faivre *et al.* 2013). Pour étudier les propriétés des modèles, la construction ou le choix d'une statistique de test est nécessaire ainsi que sa distribution sous l'hypothèse nulle ou H_0 , *i.e.* représentation des attendus au hasard. A ce titre, une attention toute particulière doit être accordée à leur construction (Janovy *et al.* 1995, Haukisaalmi & Henttonen 1998). Par exemple, lors de la construction de la méthode de screening (Vaumourin *et al.* 2014), la plus simple des hypothèses nulles a été posée : l'indépendance entre les parasites. Par contre, lors du développement du modèle probabiliste (Vaumourin *et al.* 2013), la construction d'un modèle nul a été réalisée au vu d'hypothèses biologiques actuelles. Cependant, ces hypothèses, du fait qu'elles soient issues de nos connaissances actuelles de la réalité, sont amenées à évoluer. Par exemple, la transmission verticale des bactéries du genre *Bartonella* est un sujet de discussion encore ouvert à l'heure actuelle (Guptill *et al.* 1998, Kosoy *et al.* 1998, Birtles *et al.* 2001).

Les études de puissance sont utiles pour comparer des méthodes entre elles. La construction amenant à la différenciation des H1 est difficile en théorie et en pratique. Lorsqu'il y a peu de différences entre les hypothèses alternatives H1 et les hypothèses nulles H0 (*i.e.* faibles distinctions), il est difficile de mettre en évidence le phénomène étudié (*e.g.* associations, interactions). Les H1 sont spécifiques aux modèles biologiques étudiés (*e.g.* persistance, pathogénicité, transmission), mais limitées aux connaissances actuelles, donc fluctuantes. Elles nécessitent des validations expérimentales (Flack *et al.* 2006, Otterstatter & Thomson 2007). L'expérimentation et la modélisation sont des approches plus ou moins congruentes avec la réalité complexe (Fenton *et al.* 2014, Moniuszko *et al.* 2014). Cependant, le lien entre les études théoriques et empiriques est essentiel. Il permet, notamment, de quantifier l'importance relative des paramètres biologiques (*e.g.* densité et diversité des hôtes, des vecteurs et des parasites, Telfer *et al.* 2012).

La problématique de recherche détermine donc le choix du protocole d'observation ainsi que celui de la stratégie d'analyse statistique. Récemment, des outils d'analyse développés en écologie des communautés ont été appliqués à d'autres domaines, par exemple à la biologie de l'invasion (Shea & Chesson 2002) ou à l'impact des contaminants sur les écosystèmes (Rohr *et al.* 2006). Cela ouvre des voies pour étudier les communautés de parasites. Par exemple, des analogies entre le système prédateurs – proies (utilisant les équations de Lotka-Volterra) et celui hôtes – parasites ou parasites – parasites ont déjà été proposées (Murrell 2005, Martcheva *et al.* 2007, Fenton & Perkins 2010, Murrell 2010). Adapter et utiliser des méthodes d'autres disciplines est un atout pour trouver plus rapidement des modèles décrivant au mieux la réalité. Cela peut aussi donner des voies possibles pour prendre en compte des facteurs de risque communs permettant ainsi de distinguer une association d'une interaction. Ces facteurs existant à toutes les échelles (*e.g.* spatiale, temporelle), leur prise en compte est actuellement un défi méthodologique majeur pour l'étude du multiparasitisme.

III. Conséquences épidémiologiques, médicales et agronomiques du multiparasitisme

(Des épées de Damoclès)

Les conséquences du multiparasitisme sont la résultante des interactions entre parasites au sein des hôtes. Elles ne sont pas simplement la somme des effets des mono-infections mais plus la combinaison d'effets connus et nouveaux sur des paramètres clé en épidémiologie (*e.g.* Courchamp *et al.* 1997, Malakar *et al.* 1999, Fonseca *et al.* 2005, Herrmann *et al.* 2013). La non-prise en compte de ces interactions fausse la vision que l'on a de la réalité, notamment vis-à-vis d'un parasite donné

(Pedersen & Fenton 2007, Griffiths *et al.* 2011). Ceci a des conséquences du point de vue épidémiologique, sur les incidences de maladies infectieuses, et du point de vue médical, sur le diagnostic, les traitements et la prévention des maladies infectieuses. Nous allons aborder ces différents points en nous appuyant sur des exemples concrets illustrant : 1) les conséquences des multi-infections sur les symptômes, la durée d'infection et les traitements des maladies infectieuses, 2) la nécessité de prendre en compte les conséquences des multi-infections sur la transmission des parasites concernés pour comprendre les variations d'incidence de ces maladies infectieuses et pour assurer de bons diagnostics et 3) la nécessité de prendre en compte les conséquences de l'exposition des hôtes à de multiples parasites pour disposer de moyens de prévention efficaces (voir **Figure 3**).

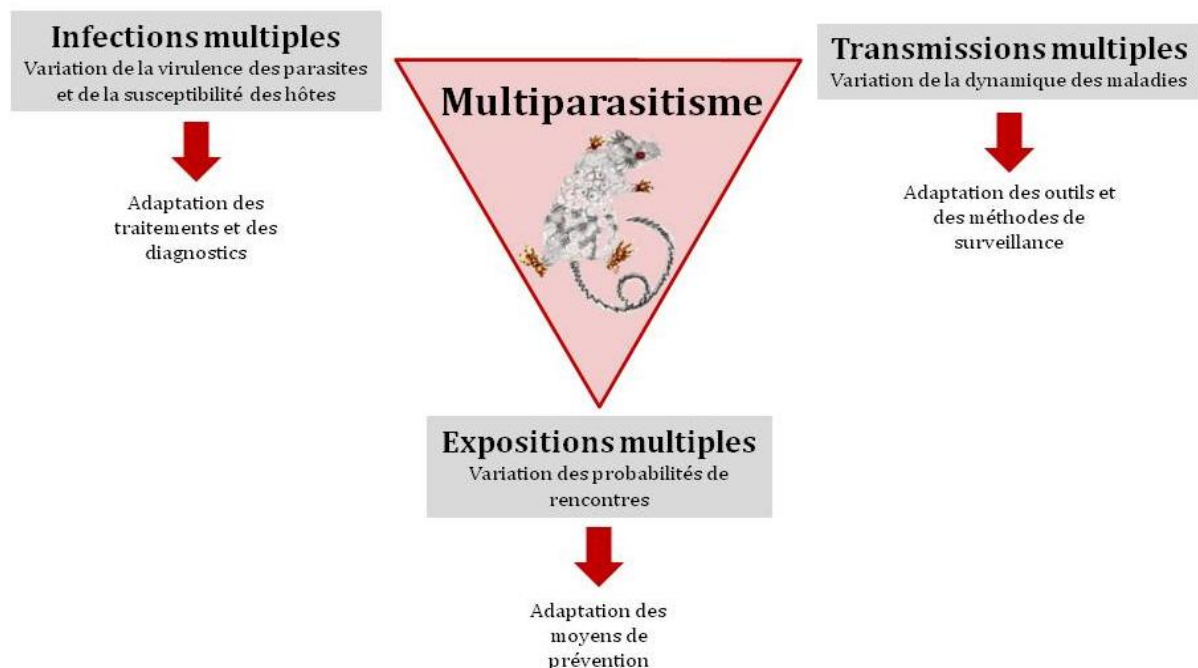


Figure 3 : L'ensemble des conséquences possibles du multiparasitisme et les potentielles solutions.

1. Conséquences des multi-infections sur les symptômes (*i.e.* la sévérité), la durée d'infection et le traitement des maladies infectieuses

(« *Citius, Altius, Fortius* »)

Les symptômes sont la résultante de la virulence du parasite (*i.e.* la capacité d'un parasite à se multiplier et à causer des dommages à son hôte, Calow 1998) et de la susceptibilité (*i.e.* sensibilité au parasite) de l'hôte. La virulence est modulée par les interactions entre les différentes espèces de parasites présentes dans l'hôte, agissant essentiellement sur la durée des infections et la multiplication des parasites (Gershwin *et al.* 2005, Ives *et al.* 2011, Dantas & Sommer 2012).

Les conséquences de telles variations peuvent être négatives, allant de la présence de symptômes atypiques à l'accélération de la mortalité des individus hôtes. Par exemple, Jolles *et al.* (2008), ont mis en évidence que les coinfections entre des nématodes et l'agent de la tuberculose peuvent accélérer la mortalité des buffles et augmenter la durée de l'état infectieux (*i.e.* état propice à la transmission des parasites) des hôtes coinfectés.

Cependant, les conséquences des variations de la virulence peuvent être positives, allant de l'inhibition de la croissance d'un parasite particulier à la diminution des risques de mortalité des individus hôtes, tout dépend des conditions environnementales et de l'ordre d'infection des hôtes par les parasites (Jardi *et al.* 2001, Franco *et al.* 2003, Thomas *et al.* 2003, Massey *et al.* 2004, Cirimotich *et al.* 2011, Ayres 2013). Par exemple, lors de coinfections, le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'hépatite C (VHC) inhibent de façon réciproque leur réplication. Toutefois, il semblerait que le virus de l'hépatite C soit dominant (*i.e.* effet inhibiteur plus fort) vis-à-vis du virus de l'hépatite B. Du point de vue clinique, chez les patients atteints de multiples hépatites, et plus généralement chez les hôtes multi-infectés, il est important de déterminer lequel de ces virus, ou parasites, sera le dominant (*i.e.* celui qui provoque les symptômes les plus sévères). Ainsi, une des priorités en terme de traitements sera d'administrer, à l'hôte, le traitement spécifique au parasite qui provoque le plus de dommages (*e.g.* pour les multi-infections de virus d'hépatites, Jardi *et al.* 2001). Par exemple, étant donné que le virus de l'herpès simplex de type 2 et le VIH sont en interaction synergique, une thérapie anti-herpétique pourrait permettre de diminuer le taux de transmission du VIH (Albrecht *et al.* 1989, Kucera *et al.* 1990, Horvath & Raffanti 1994, Schacker *et al.* 2002, Celum 2004, Corey *et al.* 2004, Van de Perre *et al.* 2008). En réponse au multiparasitisme, une autre stratégie de soin peut également être mise en place : la multi-thérapie, pour traiter différents parasites en même temps. Il est également possible d'utiliser les interactions antagonistes entre certains parasites pour lutter contre d'autres parasites d'importance médicale (Stiehm 2006). C'est notamment le cas dans les phagothérapies où des virus bactériophages lytiques sont utilisés pour traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne (Inal 2003, Efrony *et al.* 2009, Roossinck 2011). L'utilisation de virophages devient également une voie thérapeutique potentielle à l'encontre de certaines maladies infectieuses d'origine virale, avec la découverte du virus Spoutnik qui inhibe la croissance du mimivirus du protozoaire *Acanthamoeba polyphaga* (La Scola *et al.* 2008, Taylor *et al.* 2014).

2. Conséquences des multi-infections sur la transmission et le diagnostic des maladies infectieuses

(Des effets de groupe plus ou moins visibles)

L'incidence correspond au nombre de nouveaux cas d'infections d'une maladie en particulier par unité de temps et de lieu. Du fait des différents mécanismes d'interactions que l'on a vus précédemment, l'incidence d'une maladie peut être intimement liée à celle d'une autre. Ceci est principalement dû au fait que la présence d'un ou plusieurs parasites va modifier (positivement ou négativement) la probabilité d'infection d'un autre parasite, le taux de transmission des parasites et la sensibilité des hôtes (Holmes 1961, Beldomenico & Begon 2010). Ce sont évidemment les cas d'interactions positives qui sont les plus connus. Cela peut conduire à l'émergence ou la ré-émergence de maladies (Fätkenheuer *et al.* 1999, Marvá *et al.* 2014). Le plus emblématique des exemples, est celui de l'augmentation conjointe de l'incidence de deux maladies rares, la pneumonie causée par *Pneumocystis carinii* (Gottlieb 2006) et le cancer de la peau, le sarcome de Kaposi (Friedman-Kien *et al.* 1981, Hymes *et al.* 1981), du fait d'infections par le VIH. Le VIH, en diminuant la réponse immunitaire des individus a permis à de multiples infections de se développer. Cet exemple est une illustration de syndémie, ce terme définissant la convergence (synchronisation des épidémies) de deux maladies ou plus qui agissent de façon synergique pour accroître le « fardeau » des maladies (Herring & Sattenspiel 2007). D'autres exemples de syndémies sont observés comme les maladies à tiques avec les associations des agents de la borréliose, babésiose et ehrlichiose (Mitchell *et al.* 1996, Thompson *et al.* 2001, Brogden *et al.* 2005). Cette syndémie se traduit par des manifestations cliniques variables et souvent plus sévères, qui ont pour conséquences de mauvais diagnostics et l'administration de traitements antimicrobiens peu appropriés. Le tandem influenza – tuberculose est également une syndémie qui a pour conséquences de fortes surmortalités dans les populations touchées. Les infections couplées d'*Escherichia coli* et des agents des bronchites infectieuses sont aussi de bons exemples de syndémies. Elles causent des réponses inflammatoires exagérées amenant, notamment, à d'importantes pertes commerciales quand elles touchent les élevages (Dwars *et al.* 2009). Ce concept de syndémie est également vrai en agronomie, par exemple le virus du jaunissement des nervures du concombre (*i.e.* Cucumber Vein Yellowing Virus ou CVYV) et le virus du rabougrissement jaune des cucurbitacées (*i.e.* Cucurbit Yellow Stunting Disorder Virus ou CYSDV) agissent en synergie, affectant le rendement et la qualité de la production (Gil-Salas *et al.* 2012).

Avoir une vision multiparasitaire permet, dans certains cas, de pouvoir détecter les origines des recrudescences ou raréfactions des maladies et ainsi d'adapter nos outils de veille et nos méthodes de

surveillance. Par exemple, la découverte du VIH, *via* l'augmentation conjointe de l'incidence de deux maladies rares, met en évidence que les maladies rares peuvent servir d'indicateurs, permettant ainsi d'alerter les populations sur la possible émergence d'autres maladies.

La détection des maladies infectieuses est une étape délicate étant donné qu'un test positif pour un agent pathogène n'exclut pas la possibilité que l'hôte soit aussi infecté par d'autres agents pathogènes. Si les recherches s'arrêtent là, le diagnostic ne sera que partiel. Les traitements administrés ne seront donc pas forcément efficaces (Gandhi *et al.* 2010). A l'heure actuelle, le corps médical est de plus en plus conscient de ces limites et teste souvent plusieurs agents pathogènes. Les recherches sur les associations et les interactions entre parasites permettent de guider ses choix. Par exemple, on sait que les tiques transmettent de nombreux agents pathogènes (*e.g.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. et *Bartonella* spp.). Cette connaissance serait utile aux médecins pour établir un diagnostic plus exhaustif dans le cas où le patient a été mordu par une tique (Mitchell *et al.* 1996, Nicolson 2007).

3. Conséquences de l'exposition des hôtes à de multiples parasites sur la prévention des maladies infectieuses

(L'utilisation de nos connaissances comme boule de cristal)

Le multiparasitisme ayant un fort impact qualitatif et quantitatif sur la circulation des agents concernés, il est une donnée capitale à prendre en compte lors de la mise en place de moyens de prévention des maladies infectieuses (Keesing *et al.* 2010).

Malgré l'altération de leur efficacité, due aux interactions entre parasites (Sabin *et al.* 1996, Cooper *et al.* 2001, Elias *et al.* 2005), les programmes de vaccination restent tout de même des moyens de prévention utiles pour réduire l'exposition des hôtes à plusieurs parasites. Ils sont d'autant plus importants quand ils limitent la rencontre entre plusieurs parasites synergiques (Zuin *et al.* 1992). Les vaccins contre les vecteurs, qui transmettent de nombreux agents pathogènes, sont également un bon outil permettant de limiter l'exposition des hôtes à de multiples parasites (Merino *et al.* 2013).

La prévention contre les maladies vectorielles peut également s'effectuer par le contrôle de la dispersion des agents pathogènes par les vecteurs *via* l'utilisation des interactions antagonistes entre certains parasites. Par exemple, chez les moustiques *Aedes aegypti*, il a été mis en évidence que la bactérie symbiotique *Wolbachia* limitait la multiplication des virus de la dengue, du Chikungunya et des agents de la malaria (Tortosa *et al.* 2008, Mousson *et al.* 2010, Mousson *et al.* 2012). Ainsi l'introduction de cette bactérie dans certaines populations de moustiques serait une stratégie

potentielle de contrôle de la propagation de ces trois agents pathogènes d'importance capitale en santé humaine.

L'effet barrière du multiparasitisme peut également être exploité au bénéfice des hôtes. Les phénomènes de compétition entre parasites peuvent limiter le nombre d'agents pathogènes infectant un hôte. Par exemple, les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries ou levures) qui, ajoutés comme compléments à certains produits alimentaires, peuvent limiter le nombre de pathologies intestinales d'origine infectieuse et stimuler le système immunitaire de l'hôte (Sleator 2010). En agroalimentaire, cet effet barrière est d'intérêt capital étant donné qu'il permet de prévenir les contaminations des aliments par des parasites d'importance médicale (Guillier *et al.* 2008, Irlinger & Mounier 2009). Par exemple, les biofilms *Staphylococcus sciuri* limitent l'adhérence et la croissance de *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose, notamment sur les surfaces en acier inoxydable. Ces interactions permettent de renforcer la lutte contre la contamination par *L. monocytogenes* dans les locaux de l'industrie alimentaire (Leriche & Carpentier 2000). Cependant, plus que les organismes vivants, les industriels veulent développer l'utilisation directe des toxines (*e.g.* bactériocines) produites par certains parasites (McAuliffe *et al.* 1999).

Conclusions

Dans cet article, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement au multiparasitisme au sein d'un hôte. Toutefois, pour étudier de façon exhaustive le multiparasitisme, il est nécessaire de développer des méthodes d'analyses qui permettent d'avoir une vision « multi-hôtes – multi-parasites » et non plus concentrées sur l'étude « un hôte – un parasite » (voir **Figure 4**).

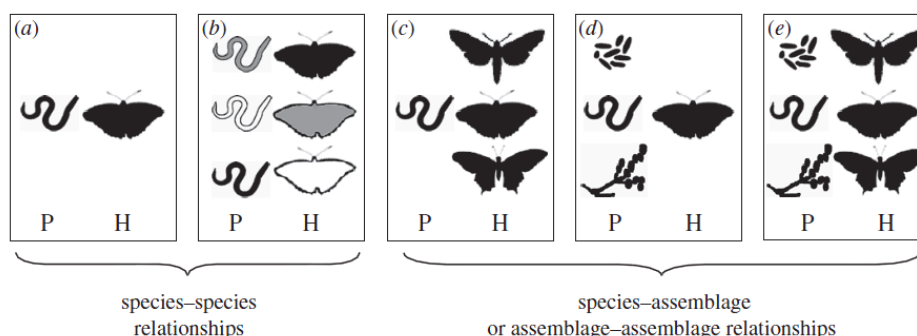


Figure 4. L'augmentation des niveaux de complexité dans l'étude des associations hôte-parasite. (a, b) Les enquêtes traditionnelles se concentrent sur les interactions espèces-espèces ; (c, d) un nombre croissant d'études ont commencé à étudier les relations espèces-assemblage, (e) mais toute la complexité (*i.e.* relations assemblage-assemblage) est actuellement peu étudiée. P et H sont respectivement des parasites ou des hôtes. C'est une illustration fictive de trois espèces de papillons qui interagissent avec des nématodes, des microsporidies et des champignons. Les différentes nuances de couleur désignent différents génotypes. Par souci de simplification, les différents génotypes des différentes espèces d'hôtes et de parasites ne sont pas indiqués dans (c), (d) et (e) (d'après Rigaud *et al.* 2010).

Quatre perspectives majeures de recherches, sur les interactions dans un contexte de multiparasitisme, émergent des travaux actuels : 1) La détection des interactions à l'échelle des communautés reste un défi méthodologique (Pedersen & Fenton 2007), 2) l'identification et la prise en compte des facteurs de risque communs est l'une des voies de progression importante pour une meilleure connaissance des interactions biologiques. A l'heure actuelle, leur intégration dans les modèles théoriques est complexe (Mahiane *et al.* 2010, Hellard *et al.* 2012, Sherlock *et al.* 2013), Des voies de recherches potentielles sont possibles, notamment *via* les méthodes des réseaux et de screening des associations. Cependant, il est nécessaire de développer la conceptualisation de tests statistiques pour les réseaux, 3) la prise en compte dans les modèles d'analyse de la non-indépendance entre les individus hôtes (*e.g.* la contagion) est également capitale étant donné que le multiparasitisme impacte la dynamique de transmission des parasites concernés et 4) il est important d'améliorer, au vu des connaissances biologiques actuelles, les méthodes utilisées pour étudier le multiparasitisme en milieu contrôlé (Fenton *et al.* 2002, 2014). Ceci, pour mimer au mieux la réalité afin d'identifier et de comprendre les mécanismes réels d'interactions entre parasites. Enfin il est primordial de promouvoir la multidisciplinarité des approches et des disciplines pour une meilleure compréhension du multiparasitisme et de ses conséquences.

Perspectives majeures dans l'étude des interactions multiparasitaires

- (1) Mettre au point des méthodes pour pouvoir détecter les interactions à l'échelle globale (*i.e.* niveau d'action des processus clés).
- (2) Améliorer la distinction entre interactions et associations en prenant en compte les facteurs de risque communs.
- (3) Améliorer la gestion, dans les modèles d'analyse, de la non-indépendance entre les individus hôtes (*e.g.* la contagion).
- (4) Améliorer les méthodes utilisées en milieu contrôlé pour mimer au mieux la réalité afin d'identifier les mécanismes réels d'interactions.

Remerciements

We are grateful to the « Tiques et Maladies à Tiques » working group of the « Réseau Ecologie des Interactions Durables » for discussion and support. This modeling work was supported by the Animal Health department of National Institute of Agronomic Research (<http://www.inra.fr>), Auvergne region (<http://www.auvergnesciences.com>), the Metaprogramme MEM (projet Patho-Id) of INRA and the EU grant FP7-261504 EDENext. It is catalogued by the EDENext Steering

Committee as EDENextXX (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Références

- Abu-Raddad L.J., Patnaik P. & Kublin J.G. (2006) Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science*, **314**, 1603-6
- Adegnik A.A. & Kremsner P.G. (2012) Epidemiology of malaria and helminth interaction: a review from 2001 to 2011. *Current Opinion in HIV and AIDS*, **7**, 221-224
- Agresti A. (2002) Categorical data analysis. (2nd edition), 710. John Wiley & Sons, Inc.
- Akira S., Uematsu S. & Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801
- Albrecht M.A., DeLuca N.A., Byrn R.A., Schaffer P.A. & Hammer S.M. (1989) The herpes simplex virus immediate-early protein, ICP4, is required to potentiate replication of human immunodeficiency virus in CD4+ lymphocytes. *Journal of Virology*, **63**, 1861-1868
- Alizon S. & van Baalen M. (2008) Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, **172**, E150-68
- Allan G. (2004) PMWS: experimental model and co-infections. *Veterinary Microbiology*, **98**, 165-168
- Allan G.M. (2000) A Sequential Study of Experimental Infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus: Immunostaining of Cryostat Sections and Virus Isolation. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, **47**, 81-94
- Andersen P.K., Borgan Ø., Gill R.D. & Keiding N. (1993) Statistical Models Based on Counting Processes. Springer-Verlag
- Anderson R.M. & May R.M. (1979) Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature*, **280**, 361-367
- Atashili J., Poole C., Ndumbe P.M., Adimora A.A. & Smith J.S. (2008) Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*, **22**, 1493-501
- Ayres J.S. (2013) Inflammasome-microbiota interplay in host physiologies. *Cell Host Microbe*, **14**, 491-497
- Bader J.A., Nusbaum K.E. & Shoemaker C.A. (2003) Comparative challenge model of *Flavobacterium columnare* using abraded and unabraded channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, **26**, 461-467
- Bakaletz L.O. (1995) Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. *Trends in Microbiology*, **3**, 110-114
- Bandilla M., Valtonen E.T., Suomalainen L.R., Aphalo P.J. & Hakalahti T. (2006) A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *International Journal for Parasitology*, **36**, 987-91
- Barry J.D. & Turner C.M. (1991) The dynamics of antigenic variation and growth of African trypanosomes. *Parasitology Today*, **7**, 207-211
- Bascompte J., Jordano P., Melian C.J. & Olesen J.M. (2003) The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 9383-9387
- Bascompte J. (2007) Networks in ecology. *Basic and Applied Ecology*, **8**, 485-490
- Behnke J., Bajer A., Sinski E. & Wakelin D. (2001) Interactions involving intestinal nematodes of rodents: experimental and field studies. *Parasitology*, **122**, S39-S49
- Behnke J.M. (2008) Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions or pure randomness? *Parasitology*, **135**, 751-66
- Beldomenico P.M. & Begon M. (2010) Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 21-27
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, **57**, 289-300
- Birtles R.J., Hazel S.M., Bennett M., Bown K., Raoult D. & Begon M. (2001) Longitudinal monitoring of the dynamics of infections due to *Bartonella* species in UK woodland rodents. *Epidemiology and Infection*, **126**, 323-329
- Bonsall M.B. & Benmayor R. (2005) Multiple infections alter density dependence in host-pathogen interactions. *Journal of Animal Ecology*, **74**, 937-945
- Booth M., Li Y. & Tanner M. (1996) Helminth infections, morbidity indicators and schistosomiasis treatment history in three villages, Dongting Lake region, PR China. *Tropical Medicine & International Health*, **1**, 464-474
- Borachi D., Abebe Alemayehu M., Aseffa A., Chiodi F., Chisi J., Del Prete G., Doherty T.M., Elhassan I., Engers H., Gyan B., Harandi A.M., Kariuki T., Kironde F., Kouriba B., Langhorne J., Laskay T., Medaglini D., Olesen O., Onyebujoh P., Palma C., Sauerwein R., Sibanda E., Steinhoff U., Tagliabue A., Thiel A., Vahedi M. & Troye-Blomberg M. (2008) Immunity against HIV/AIDS, malaria, and tuberculosis during co-infections with neglected infectious diseases: recommendations for the European Union research priorities. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**, e255
- Bord S., Druilhet P., Gasqui P., Abrial D. & Vourc'h G. (2014) Bayesian estimation of abundance based on removal sampling under weak assumption of closed population with catchability depending on environmental conditions. Application to tick abundance. *Ecological Modelling*, **274**, 72-79
- Bordes F. & Morand S. (2009) Coevolution between multiple helminth infestations and basal immune investment in mammals: cumulative effects of polyparasitism? *Parasitology Research*, **106**, 33-37
- Bordes F. & Morand S. (2011) The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology & Epidemiology*, **1**, 1
- Bosch A.A., Biesbroek G., Trzcinski K., Sanders E.A. & Bogaert D. (2013) Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003057

- Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard J.C., Naitali M. & Briandet R. (2014) Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 365, 253-255
- Brogden K.A., Guthmiller J.M. & Taylor C.E. (2005) Human polymicrobial infections. *The Lancet*, **365**, 253-255
- Brossard M. & Wikel S. (2004) Tick immunobiology. *Parasitology*, **129**, S161-S176
- Brown C.R. & Brown M.B. (2004) Empirical measurement of parasite transmission between groups in a colonial bird. *Ecology*, **85**, 1619-1626
- Brown D. & Rothery P. (1993) Models in biology: mathematics, statistics and computing. John Wiley & Sons Ltd.
- Buono L., Lopez-Villavicencio M., Shykoff J.A., Snirc A. & Giraud T. (2014) Influence of multiple infection and relatedness on virulence: disease dynamics in an experimental plant population and its castrating parasite. *PLoS One*, **9**, e98526
- Bush A.O. & Holmes J.C. (1986) Intestinal helminths of lesser scaup ducks: an interactive community. *Canadian Journal of Zoology*, **64**, 142-152
- Calow W. (1998) Handbook of environmental risk assessment and management. 590 p. Blackwell Science
- Casadevall A. & Pirofski L.A. (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*, **68**, 6511-6518
- Cattadori I.M., Haydon D.T. & Hudson P.J. (2005) Parasites and climate synchronize red grouse populations. *Nature*, **433**, 737-741
- Celum C.L. (2004) The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. *Herpes*, **11**, 36A-45A
- Chang J.Y., Antonopoulos D.A., Kalra A., Tonelli A., Khalife W.T., Schmidt T.M. & Young V.B. (2008) Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*, **197**, 435-438
- Choisy M., Guégan J.-F. & Rohani P. (2007) Mathematical Modeling of Infectious Diseases Dynamics. *Encyclopedia of Infectious Diseases - Modern Methods*. 379-404. John Wiley and Sons
- Choisy M. (2010) Modélisation mathématique en épidémiologie. *Écologie de la santé et conservation*. De Boeck Université
- Christensen N.Ø., Nansen P., Fagbemi B.O. & Monrad J. (1987) Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitology Research*, **73**, 387-410
- Cirimotich C.M., Dong Y., Clayton A.M., Sandiford S.L., Souza-Neto J.A., Mulenga M. & Dimopoulos G. (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, **332**, 855-8
- Clark J.S. & Hersh M.H. (2009) Inference in incidence, infection, and impact: Co-infection of multiple hosts by multiple pathogens. *Bayesian Analysis*, **4**, 337-365
- Commenges D. (1999) Multi-state models in epidemiology. *Lifetime Data Analysis*, **5**, 315-327
- Cooper P.J., Chico M., Sandoval C., Espinel I., Guevara A., Levine M.M., Griffin G.E. & Nutman T.B. (2001) Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infection and Immunity*, **69**, 1574-80
- Corey L., Wald A., Celum C.L. & Quinn T.C. (2004) The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, **35**, 435-445
- Courchamp F., Suppo C., Fromont E. & Bouloux C. (1997) Dynamics of two feline retroviruses (fiv and felv) within one population of cats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **264**, 785-794
- Cox F.E.G. (2001) Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, **122**, S23-S38
- Crompton D.W.T. & Tulley J.J. (1987) How much Ascariasis is there in Africa? *Parasitology Today*, **3**, 123-127
- Csardi G. & Nepusz T. (2006) The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems* **1695**,
- Cunningham A.L., Turner R.R., Miller A.C., Para M.F. & Merigan T.C. (1985) Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *Journal of Clinical Investigation*, **75**, 226
- Dantas G. & Sommer M.O. (2012) Context matters - the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Current Opinion in Microbiology*, **15**, 577-82
- Dash K.M. (1981) Interaction between *Oesophagostomum columbianum* and *Oesophagostomum venulosum* in sheep. *International Journal for Parasitology*, **11**, 201-207
- Daskin J.H. & Alford R.A. (2012) Context-dependent symbioses and their potential roles in wildlife diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **279**, 1457-65
- Dobson A. & Roberts M. (1994) The population dynamics of parasitic helminth communities. *Parasitology*, **109**, S97-S108
- Dwars R.M., Matthijs M.G., Daemen A.J., van Eck J.H., Vervelde L. & Landman W.J. (2009) Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **127**, 65-76
- Efrony R., Atad I. & Rosenberg E. (2009) Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA3. *Current Microbiology*, **58**, 139-145
- Elias D., Akuffo H., Pawlowski A., Haile M., Schon T. & Britton S. (2005) *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, **23**, 1326-34
- Ellis R.D., Pung O.J. & Richardson D.J. (1999) Site selection by intestinal helminths of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *The Journal of Parasitology*, **85**, 1-5
- Ezenwa V.O. (2004) Host social behavior and parasitic infection: a multifactorial approach. *Behavioral Ecology*, **15**, 446-454
- Ezenwa V.O. & Jolles A.E. (2011) From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integrative and Comparative Biology*, **51**, 540-51

- Fahrmeir L. & Tutz G. (1994) Multivariate Statistical Modelling Based on Generalized Linear Models. Springer
- Faivre R., Iooss B., Mahévas S., Makowski D. & Monod H. (2013) Analyse de sensibilité et exploration de modèles: Application aux sciences de la nature et de l'environnement. Editions Quae
- Falzon G., Schneider D., Trotter M. & Lamb D.W. (2013) A relationship between faecal egg counts and the distance travelled by sheep. *Small Ruminant Research*, **111**, 171-174
- Fätkenheuer G., Taelman H., Lepage P., Schwenk A. & Wenzel R. (1999) The return of tuberculosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **34**, 139-146
- Fenton A., Fairbairn J.P., Norman R. & Hudson P.J. (2002) Parasite transmission: reconciling theory and reality. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 893-905
- Fenton A. (2008) Worms and germs: the population dynamic consequences of microparasite-macroparasite co-infection. *Parasitology*, **135**, 1545-1560
- Fenton A. & Perkins S.E. (2010) Applying predator-prey theory to modelling immune-mediated, within-host interspecific parasite interactions. *Parasitology*, **137**, 1027-1038
- Fenton A., Knowles S.C., Petchey O.L. & Pedersen A.B. (2014) The reliability of observational approaches for detecting interspecific parasite interactions: comparison with experimental results. *International Journal for Parasitology*, **44**, 137-142
- Ferrari N., Cattadori I.M., Rizzoli A. & Hudson P.J. (2009) *Heligmosomoides polygyrus* reduces infestation of *Ixodes ricinus* in free-living yellow-necked mice, *Apodemus flavicollis*. *Parasitology*, **136**, 305-16
- Flack J.C., Girvan M., de Waal F.B. & Krakauer D.C. (2006) Policing stabilizes construction of social niches in primates. *Nature*, **439**, 426-429
- Fonseca M.O., Pang L.W., de Paula Cavalheiro N., Barone A.A. & Heloisa Lopes M. (2005) Randomized trial of recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected adult patients comparing a standard dose to a double dose. *Vaccine*, **23**, 2902-8
- Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O. & Dantas G. (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, **337**, 1107-11
- Franco D.J., Vago A.R., Chiari E., Meira F.C.A., Galvão L.M.C. & Machado C.R.S. (2003) *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Experimental Parasitology*, **104**, 54-61
- Freeman L.C. (1977) A Set of Measures of Centrality Based on Betweenness. *Sociometry*, **40**, 35-41
- Friedman-Kien A., Laubenstein L., Marmor M., Hymes K., Green J., Ragaz A., Gottlieb J., Muggia F., Demopoulos R. & Weintraub M. (1981) Kaposi sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **30**, 305-308
- Friggens M.M. & Brown J.H. (2005) Niche partitioning in the cestode communities of two elasmobranchs. *Oikos*, **108**, 76-84
- Frontera E., Alcaide M., Dominguez-Alpizar J.L., Boes J., Reina D. & Navarrete I. (2005) Evidence of interaction between *Ascaris suum* and *Metastrongylus apri* in experimentally infected pigs. *Veterinary Parasitology*, **127**, 295-301
- Galan-Puchades M.T. & Osuna A. (2012) Chagas Disease in a Wormy World. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia*, **71**, 5-13
- Gandhi N.R., Shah N.S., Andrews J.R., Vella V., Moll A.P., Scott M., Weissman D., Marra C., Laloo U.G. & Friedland G.H. (2010) HIV coinfection in multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **181**, 80-86
- Gauch H.G. (1982) Multivariate analysis in community ecology. Cambridge University Press
- Gershwin L.J., Berghaus L.J., Arnold K., Anderson M.L. & Corbeil L.B. (2005) Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **107**, 119-30
- Gil-Salas F.M., Peters J., Boonham N., Cuadrado I.M. & Janssen D. (2012) Co-infection with *Cucumber vein yellowing virus* and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* leading to synergism in cucumber. *Plant Pathology*, **61**, 468-478
- Godfrey S.S. (2013) Networks and the ecology of parasite transmission: A framework for wildlife parasitology. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **2**, 235-245
- Gokaydin D., Oliveira-Martins J.B., Gordo I. & Gomes M.G. (2007) The reinfection threshold regulates pathogen diversity: the case of influenza. *Journal of the Royal Society Interface*, **4**, 137-142
- Gottlieb M.S. (2006) Pneumocystis Pneumonia—Los Angeles. *American Journal of Public Health*, **96**, 980
- Graham A.L. (2008) Ecological rules governing helminth-microparasite coinfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 566-570
- Griffin R.H. & Nunn C.L. (2011) Community structure and the spread of infectious disease in primate social networks. *Evolutionary Ecology*, **26**, 779-800
- Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A. & Petchey O.L. (2011) The nature and consequences of coinfection in humans. *Journal of Infection*, **63**, 200-6
- Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A. & Petchey O.L. (2014) Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most via shared resources. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20132286
- Grmek M.D. (1969) Préliminaires d'une étude historique des maladies. *Annales. Histoire, Sciences Sociales*, **24**, 1473-1483
- Guernier V., Hochberg M.E. & Guégan J.-F. (2004) Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biology*, **2**, e141
- Guillier L., Stahl V., Hezard B., Notz E. & Briandet R. (2008) Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, **128**, 51-57
- Guptill L., Slater L.N., Wu C.-C., Lin T.-L., Glickman L.T., Welch D.F., Tobolski J. & HogenEsch H. (1998) Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **65**, 177-189
- Haine E.R., Boucansaud K. & Rigaud T. (2005) Conflict between parasites with different transmission strategies

- infecting an amphipod host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **272**, 2505-10
- Harms G. & Feldmeier H. (2002) Review: HIV infection and tropical parasitic diseases—deleterious interactions in both directions? *Tropical Medicine & International Health*, **7**, 479-488
- Haukisaalmi V. & Henttonen H. (1993) Coexistence in Helminths of the Bank Vole *Clethrionomys glareolus*. II. Intestinal Distribution and Interspecific Interactions. *The Journal of Animal Ecology*, **62**, 230-238
- Haukisaalmi V. & Henttonen H. (1993) Coexistence in Helminths of the Bank Vole *Clethrionomys glareolus*. I. Patterns of Co-Occurrence. *The Journal of Animal Ecology*, **62**, 221-229
- Haukisaalmi V. & Henttonen H. (1998) Analysing interspecific associations in parasites: alternative methods and effects of sampling heterogeneity. *Oecologia*, **116**, 565-574
- Hellard E., Pontier D., Sauvage F., Poulet H. & Fouchet D. (2012) True versus false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses. *PLoS One*, **7**, e29618
- Heringlake S., Ockenga J., Tillmann H.L., Trautwein C., Meissner D., Stoll M., Hunt J., Jou C., Solomon N., Schmidt R.E. & Manns M.P. (1998) GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *The Journal of Infectious Diseases*, **177**, 1723-1726
- Herring D.A. & Sattenspiel L. (2007) Social contexts, syndemics, and infectious disease in northern Aboriginal populations. *American Journal of Human Biology*, **19**, 190-202
- Herrmann C., Gern L. & Voordouw M.J. (2013) Species co-occurrence patterns among Lyme borreliosis pathogens in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 7273-7280
- Higgs S. & Nowell F. (2000) Population biology of *Eimeria* (Protozoa: Apicomplexa) in *Apodemus sylvaticus*: a capture/recapture study. *Parasitology*, **120**, 355-363
- Holland C. (1984) Interactions between *Moniliformis* (Acanthocephala) and *Nippostrongylus* (Nematoda) in the small intestine of laboratory rats. *Parasitology*, **88**, 303-315
- Holm S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, 65-70
- Holmes J.C. (1961) Effects of concurrent infections on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala). I. General effects and comparison with crowding. *The Journal of Parasitology*, 209-216
- Holzman C., Leventhal J.M., Qiu H., Jones N.M. & Wang J. (2001) Factors linked to bacterial vaginosis in nonpregnant women. *American Journal of Public Health*, **91**, 1664-1670
- Horvath J. & Raffanti S.P. (1994) Clinical aspects of the interactions between human immunodeficiency virus and the hepatotropic viruses. *Clinical Infectious Diseases*, **18**, 339-347
- Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Kumaresan J., Sachs S.E., Sachs J.D. & Savioli L. (2007) Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, **357**, 1018-1027
- Hougaard P. (1999) Multi-state models. A review. *Lifetime Data Analysis*, **5**, 239-264
- Hudson P.J., Dobson A.P. & Lafferty K.D. (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 381-5
- Hughes V. & Randolph S. (2001) Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology*, **123**, 365-371
- Hughes V.L. & Randolph S.E. (2009) Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *The Journal of Parasitology*, **87**, 49-54
- Hymes K.B., Greene J.B., Marcus A., William D.C., Cheung T., Prose N.S., Ballard H. & Laubenstein L.J. (1981) Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases. *The Lancet*, **318**, 598-600
- Inal J.M. (2003) Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **51**, 237-244
- Irlinger F. & Mounier J. (2009) Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**, 142-148
- Ishii T., Takatsuka J., Nakai M. & Kunimi Y. (2002) Growth Characteristics and Competitive Abilities of a Nucleopolyhedrovirus and an Entomopoxvirus in Larvae of the Smaller Tea Tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biological Control*, **23**, 96-105
- Ives A., Ronet C., Prevel F., Ruzzante G., Fuertes-Marraco S., Schutz F., Zangger H., Revaz-Breton M., Lye L.F., Hickerson S.M., Beverley S.M., Acha-Orbea H., Launois P., Fasel N. & Masina S. (2011) *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*, **331**, 775-8
- Jameson J.E. (1962) A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *Journal of Hygiene*, **60**, 193-207
- Janovy J.J., Clopton R.E., Clopton D.A., Synder S.D., Efting A. & Krebs L. (1995) Species density distributions as null models for ecological significant interactions of parasite species in an assemblage. *Ecological Modelling*, **77**, 189 – 196
- Jardi R., Rodriguez F., Buti M., Costa X., Cotrina M., Galimany R., Esteban R. & Guardia J. (2001) Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology*, **34**, 404-10
- Jesus Junior W.C., Paula Júnior T.J., Lehner M.S. & Hau B. (2014) Interactions between foliar diseases: concepts and epidemiological approaches. *Tropical Plant Pathology*, **39**, 1-18
- Jolles A.E., Ezenwa V.O., Etienne R.S., Turner W.C. & Olff H. (2008) Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology*, **89**, 2239-2250
- Jones J.D. & Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-9
- Karp C.L., Wysocka M., Wahl L.M., Ahearn J.M., Cuomo P.J., Sherry B., Trinchieri G. & Griffin D.E. (1996) Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science*, **273**, 228-231
- Kazazian H.H., Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, **303**, 1626-32
- Keesing F., Belden L.K., Daszak P., Dobson A., Harvell C.D., Holt R.D., Hudson P., Jolles A., Jones K.E., Mitchell C.E., Myers S.S., Bogich T. & Ostfeld R.S. (2010) Impacts of

- biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, **468**, 647-52
- Kishida N., Sakoda Y., Eto M., Sunaga Y. & Kida H. (2004) Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. *Archives of Virology*, **149**, 2095-2104
- Klimpel S., Forster M. & Schmahl G. (2007) Parasites of two abundant sympatric rodent species in relation to host phylogeny and ecology. *Parasitology Research*, **100**, 867-875
- Kloepfer K.M., Lee W.M., Pappas T.E., Kang T.J., Vrtis R.F., Evans M.D., Gangnon R.E., Bochkov Y.A., Jackson D.J., Lemanske R.F., Jr. & Gern J.E. (2014) Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **134**, 1035-1042
- Koelle D.M., Abbo H., Peck A., Ziegweid K. & Corey L. (1994) Direct recovery of herpes simplex virus (HSV)-specific T lymphocyte clones from recurrent genital HSV-2 lesions. *The Journal of Infectious Diseases*, **169**, 956-961
- Kosoy M., Mandel E., Green D., Marston E., Jones D. & Childs J. (2004) Prospective studies of *Bartonella* of rodents. Part II. Diverse infections in a single rodent community. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, **4**, 296-305
- Kosoy M.Y., Regnery R.L., Kosaya O.I., Jones D.C., Marston E.L. & Childs J.E. (1998) Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. *Journal of Wildlife Diseases*, **34**, 305-309
- Kucera L.S., Leake E., Iyer N., Raben D. & Myrvik Q.N. (1990) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) can coinfect and simultaneously replicate in the same human CD4+ cell: effect of coinfection on infectious HSV-2 and HIV-1 replication. *AIDS research and human retroviruses*, **6**, 641-647
- La Scola B., Desnues C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E. & Raoult D. (2008) The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455**, 100-104
- Lello J., Boag B., Fenton A., Stevenson I.R. & Hudson P.J. (2004) Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature*, **428**, 840-844
- Lello J., Knopp S., Mohammed K.A., Khamis I.S., Utzinger J. & Viney M.E. (2013) The relative contribution of co-infection to focal infection risk in children. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**, 20122813
- Leriche V. & Carpentier B. (2000) Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 594-605
- Lloyd-Smith J.O., Schreiber S.J., Kopp P.E. & Getz W.M. (2005) Superspreading and the effect of individual variation on disease emergence. *Nature*, **438**, 355-9
- Lohr J.N., Yin M. & Wolinska J. (2010) Prior residency does not always pay off – co-infections in *Daphnia*. *Parasitology*, **137**, 1493-500
- Mahiane S.G., Nguéma E.P.N., Pretorius C. & Auvert B. (2010) Mathematical models for coinfection by two sexually transmitted agents: the human immunodeficiency virus and herpes simplex virus type 2 case. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C*, **59**, 547-572
- Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D. & Allen J.E. (2004) Helminth parasites—masters of regulation. *Immunological Reviews*, **201**, 89-116
- Malakar R., Elkinton J.S., Hajek A.E. & Burand J.P. (1999) Within-host interaction of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**, 91-100
- Martcheva M., Pilyugin S.S. & Holt R.D. (2007) Subthreshold and superthreshold coexistence of pathogen variants: the impact of host age-structure. *Mathematical Biosciences*, **207**, 58-77
- Marv M., Venturino E. & de la Parra R.B. (2014) A time scales approach to coinfection by opportunistic diseases. *arXiv*, 1403.3517
- Mason L.M., Veerman C.C., Geijtenbeek T.B. & Hovius J.W. (2014) Mnage a trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends in Parasitology*, **30**, 95-103
- Massey R.C., Buckling A. & French-Constant R. (2004) Interference competition and parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271**, 785-788
- McAuliffe O., Hill C. & Ross R.P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 251-256
- McCallum H. (2008) Population parameters: estimation for ecological models. John Wiley & Sons
- McCullagh P. & Nelder J.A. (1989) Generalized Linear Models. (2nd edition), Chapman & Hall/CRC
- Merino O., Alberdi P., Perez de la Lastra J.M. & de la Fuente J. (2013) Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, **3**, 30
- Merler S., Poletti P., Ajelli M., Caprile B. & Manfredi P. (2008) Coinfection can trigger multiple pandemic waves. *Journal of Theoretical Biology*, **254**, 499-507
- Mina M.J., Burke R.M. & Klugman K.P. (2014) Estimating the prevalence of coinfection with influenza virus and the atypical bacteria *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **33**, 1035-1042
- Mitchell P.D., Reed K.D. & Hofkes J.M. (1996) Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 724-727
- Mller A., Merino S., Brown C. & Robertson R. (2001) Immune defense and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *The American Naturalist*, **158**, 136-145
- Moniuszko A., Ruckert C., Alberdi M.P., Barry G., Stevenson B., Fazakerley J.K., Kohl A. & Bell-Sakyi L. (2014) Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **5**, 415-422
- Mousson L., Martin E., Zouache K., Madec Y., Mavingui P. & Failloux A.B. (2010) *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Molecular Ecology*, **19**, 1953-64
- Mousson L., Zouache K., Arias-Goeta C., Raquin V., Mavingui P. & Failloux A.B. (2012) The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1989
- Murrell D.J. (2005) Local spatial structure and predator-prey dynamics: counterintuitive effects of prey enrichment. *The American Naturalist*, **166**, 354-367

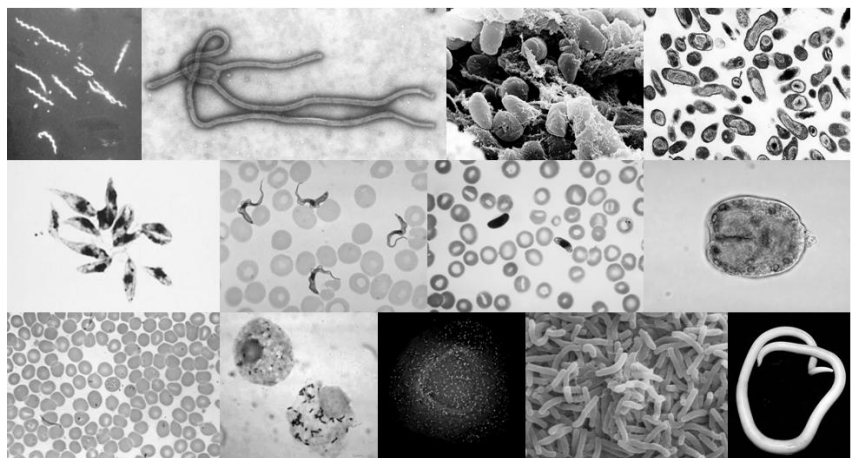
- Murrell D.J. (2010) When does local spatial structure hinder competitive coexistence and reverse competitive hierarchies? *Ecology*, **91**, 1605-1616
- Nacher M. (2004) Interactions between worm infections and malaria. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **26**, 85-92
- Nicolson G.L. (2007) Diagnosis and therapy of chronic systemic coinfections in Lyme Disease and other tick-borne infectious diseases. *Townsend Letter for Doctors and Patients*, **285**, 93
- Nolan T.J. & Smith G. (1995) Time series analysis of the prevalence of endoparasitic infections in cats and dogs presented to a veterinary teaching hospital. *Veterinary Parasitology*, **59**, 87-96
- O'Hara A.M. & Shanahan F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, **7**, 688-693
- Okmen B. & Doehlemann G. (2014) Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, **20C**, 19-25
- Otterstatter M.C. & Thomson J.D. (2007) Contact networks and transmission of an intestinal pathogen in bumble bee (*Bombus impatiens*) colonies. *Oecologia*, **154**, 411-421
- Patrick M.J. (1991) Distribution of enteric helminths in *Glaucomys volans* L. (Sciuridae): A test for competition. *Ecology*, 755-758
- Pawlowski A., Jansson M., Skold M., Rottenberg M.E. & Kallenius G. (2012) Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002464
- Pechová J., Stepanova G., Kovar L. & Kopecky J. (2002) Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitologica*, **49**, 153-159
- Pedersen A.B. & Fenton A. (2007) Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 133-139
- Pedersen A.B. & Greives T.J. (2008) The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population. *Journal of Animal Ecology*, **77**, 370-377
- Perez C.J., Lymbery A.J. & Thompson R.C. (2014) Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends in Parasitology*, **30**, 176-182
- Perry J.A. & Wright G.D. (2013) The antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 138
- Petney T.N. & Andrews R.H. (1998) Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology*, **28**, 377-393
- Poisot T., Stanko M., Miklisova D. & Morand S. (2013) Facultative and obligate parasite communities exhibit different network properties. *Parasitology*, **140**, 1340-1345
- Poulin R. (2001) Interactions between species and the structure of helminth communities. *Parasitology*, **122**, S3-S11
- Prenter J., Macneil C., Dick J.T. & Dunn A.M. (2004) Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 385-390
- Råberg L., Sim D. & Read A.F. (2007) Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, **318**, 812-814
- Råberg L., Graham A.L. & Read A.F. (2009) Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 37-49
- Rajkovic A. (2014) Microbial toxins and low level of foodborne exposure. *Trends in Food Science & Technology*,
- Richner H., Christe P. & Oppliger A. (1995) Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 1192-1194
- Rigaud T., Perrot-Minnot M.J. & Brown M.J. (2010) Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 3693-702
- Riley M.A., Goldstone C.M., Wertz J.E. & Gordon D. (2003) A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 690-697
- Rodriguez M., Terrazas L.I., Marquez R. & Bojalil R. (1999) Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunology*, **21**, 177-185
- Roff D.A. (1992) Evolution of life histories: theory and analysis. Chapman & Hall
- Rohr J.R., Kerby J.L. & Sih A. (2006) Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 606-613
- Roossinck M.J. (2011) The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 99-108
- Sabin E.A., Araujo M.I., Carvalho E.M. & Pearce E.J. (1996) Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Infectious Diseases*, **173**, 269-272
- Salvador A.R., Guivier E., Xuereb A., Chaval Y., Cadet P., Pouille M.L., Sironen T., Voutilainen L., Henttonen H., Cosson J.F. & Charbonnel N. (2011) Concomitant influence of helminth infection and landscape on the distribution of Puumala hantavirus in its reservoir, *Myodes glareolus*. *BMC Microbiology*, **11**, 30
- Schacker T., Zeh J., Hu H., Shaughnessy M. & Corey L. (2002) Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA associated with herpes simplex virus reactivation and suppression. *The Journal of Infectious Diseases*, **186**, 1718-1725
- Schur N., Gosoni L., Raso G., Utzinger J. & Vounatsou P. (2011) Modelling the geographical distribution of co-infection risk from single-disease surveys. *Statistics in Medicine*, **30**, 1761-1776
- Shea K. & Chesson P. (2002) Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 170-176
- Sherlock C., Xifara T., Telfer S. & Begon M. (2013) A coupled hidden Markov model for disease interactions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C*, **62**, 609-627
- Shorrocks B. (1990) Coexistence in a Patchy Environment. *Living in a patchy environment*. Oxford University Press
- Šimková A., Lafond T., Ondračková M., Jurajda P., Ottová E. & Morand S. (2008) Parasitism, life history traits and immune defence in cyprinid fish from Central Europe. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 29
- Singhal R.N., Jeet S. & Davies R.W. (1990) The effects of argulosis-saprolegniasis on the growth and production of *Cyprinus carpio*. *Hydrobiologia*, **202**, 27-31
- Sleator R.D. (2010) Probiotic therapy - recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathogens*, **2**, 2-5
- Smith K.F. & Carpenter S.M. (2006) Potential spread of introduced black rat (*Rattus rattus*) parasites to endemic deer

- mice (*Peromyscus maniculatus*) on the California Channel Islands. *Diversity and Distributions*, **12**, 742-748
- Snounou G. & White N.J. (2004) The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends in Parasitology*, **20**, 333-339
- Sousa W.P. (1993) Interspecific antagonism and species coexistence in a diverse guild of larval trematode parasites. *Ecological Monographs*, **63**, 104-128
- Stacy A., Everett J., Jorth P., Trivedi U., Rumbaugh K.P. & Whiteley M. (2014) Bacterial fight-and-flight responses enhance virulence in a polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 1171-1176
- Stancampiano L., Mughini Gras L. & Poglayen G. (2010) Spatial niche competition among helminth parasites in horse's large intestine. *Veterinary Parasitology*, **170**, 88-95
- Stearns S.C. (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press
- Stewart G.R., Boussinesq M., Coulson T., Elson L., Nutman T. & Bradley J.E. (1999) Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, **117**, 517
- Stiehm E.R. (2006) Disease versus disease: how one disease may ameliorate another. *Pediatrics*, **117**, 184-191
- Su Z., Segura M., Morgan K., Loredó-Osti J.C. & Stevenson M.M. (2005) Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infection and Immunity*, **73**, 3531-9
- Su Z., Segura M. & Stevenson M.M. (2006) Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infection and Immunity*, **74**, 2138-44
- Summers K., McKeon S.E.A., Sellars J.O.N., Keusenkothen M., Morris J., Gloeckner D., Pressley C., Price B. & Snow H. (2003) Parasitic exploitation as an engine of diversity. *Biological Reviews*, **78**, 639-675
- Sunagawa S., DeSantis T.Z., Piceno Y.M., Brodie E.L., DeSalvo M.K., Voolstra C.R., Weil E., Andersen G.L. & Medina M. (2009) Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *The ISME Journal*, **3**, 512-21
- Supali T., Verweij J.J., Wiria A.E., Djuardi Y., Hamid F., Kaisar M.M., Wammes L.J., van Lieshout L., Luty A.J., Sartono E. & Yazdanbakhsh M. (2010) Polyparasitism and its impact on the immune system. *International Journal for Parasitology*, **40**, 1171-1176
- Sverdlov E.D. (2000) Retroviruses and primate evolution. *Bioessays*, **22**, 161-171
- Tanaka M.M. & Feldman M.W. (1999) Theoretical considerations of cross-immunity, recombination and the evolution of new parasitic strains. *Journal of Theoretical Biology*, **198**, 145-163
- Tarleton R.L., Grusby M.J. & Zhang L. (2000) Increased Susceptibility of Stat4-Deficient and Enhanced Resistance in Stat6-Deficient Mice to Infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, **165**, 1520-1525
- Taylor B.P., Cortez M.H. & Weitz J.S. (2014) The virus of my virus is my friend: ecological effects of virophage with alternative modes of coinfection. *Journal of theoretical biology*, **354**, 1-10
- Taylor K. (1964) Genus *Rattus* (rats). *The Handbook of British Mammals*, 247-259
- Taylor L.H., Latham S.M. & Mark E.J. (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **356**, 983-989
- Telfer S., Birtles R., Bennett M., Lambin X., Paterson S. & Begon M. (2008) Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology*, **135**, 767-81
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S. & Begon M. (2010) Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, **330**, 243-246
- Telfer S., Bown K. & Dunn A. (2012) The effects of invasion on parasite dynamics and communities. *Functional Ecology*, **26**, 1288-1299
- Thomas F., Fauchier J. & Lafferty K. (2002) Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: test of the "sabotage" hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **51**, 296-301
- Thomas F., Guégan J.-F. & Renaud F. (2012) Ecologie et Evolution des systèmes parasités. De Boeck & Larcier
- Thomas M.B., Watson E.L. & Valverde-Garcia P. (2003) Mixed infections and insect-pathogen interactions. *Ecology Letters*, **6**, 183-188
- Thompson C., Spielman A. & Krause P.J. (2001) Coinfecting deer-associated zoonoses: Lyme disease, babesiosis, and ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases*, **33**, 676-685
- Thumbi S.M., de Clare Bronsvort B.M., Poole E.J., Kiara H., Toye P.G., Mbole-Kariuki M.N., Conradie I., Jennings A., Handel I.G., Wynand Coetzer J.A., Steyl J.C.A., Hanotte O. & Woolhouse M.E.J. (2014) Parasite co-infections and their impact on survival of indigenous cattle. *PLoS One*, **9**, e76324
- Tillmann H.L., Heiken H., Knapik-Botor A., Heringlake S., Ockenga J., Wilber J.C., Goergen B., Detmer J., McMorro M., Stoll M., Schmidt R.E. & Manns M.P. (2001) Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *New England Journal of Medicine*, **345**, 715-724
- Tollenaere C., Bryja J., Galan M., Cadet P., Deter J., Chaval Y., Berthier K., Ribas Salvador A., Voutilainen L., Laakkonen J., Henttonen H., Cosson J.F. & Charbonnel N. (2008) Multiple parasites mediate balancing selection at two MHC class II genes in the fossorial water vole: insights from multivariate analyses and population genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 1307-1320
- Tortosa P., Courtiol A., Moutailler S., Failloux A.B. & Weill M. (2008) Chikungunya-Wolbachia interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Molecular Biology*, **17**, 677-684
- Tosta C.E. (2001) Coevolutionary networks: a novel approach to understanding the relationships of humans with the infectious agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 415-425
- Triantos D., Leao J.C., Porter S.R., Scully C.M. & Teo C.G. (1998) Tissue distribution of Epstein-Barr virus genotypes in hosts coinfecting by HIV. *AIDS*, **12**, 2141-2146
- Val M.E., Bouvier M., Campos J., Sherratt D., Cornet F., Mazel D. & Barre F.X. (2005) The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Molecular Cell*, **19**, 559-66
- Van de Perre P., Segondy M., Foulongne V., Ouedraogo A., Konate I., Huraux J.-M., Mayaud P. & Nagot N. (2008) Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. *The Lancet Infectious Diseases*, **8**, 490-497

- van den Heuvel J.F.J.M., Verbeek M. & van der Wilk F. (1994) Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, **75**, 2559-2565
- Vannier-Santos M.A. & Lenzi H.L. (2011) Parasites or cohabitants: cruel omnipresent usurpers or creative "eminences grises"? *Journal of Parasitology Research*, **2011**, 214174
- Vaumourin E., Gasqui P., Buffet J.-P., Chapuis J.-L., Pisanu B., Ferquel E., Vayssier-Taussat M. & Vourc'h G. (2013) A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations. *PLoS One*, **8**, e66167
- Vaumourin E., Vourc'h G., Telfer S., Lambin X., Salih D., Seitzer U., Morand S., Charbonnel N., Vayssier-Taussat M. & Gasqui P. (2014) To be or not to be associated: power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 62
- Vautrin E. & Vavre F. (2009) Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology*, **17**, 95-9
- Vayssier-Taussat M., Albina E., Citti C., Cosson J.F., Jacques M.A., Lebrun M.H., Le Loir Y., Ogliastro M., Petit M.A., Roumagnac P. & Candresse T. (2014) Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 29
- Vidal-Martínez V.M. & Kennedy C.R. (2000) Potential interactions between the intestinal helminths of the cichlid fish *Cichlasoma synspilum* from southeastern Mexico. *The Journal of Parasitology*, **86**, 691-695
- Wang G., Van Dam A.P., Schwartz I. & Dankert J. (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 633-653
- Wikel S.K. (1996) Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology*, **41**, 1-22
- Wikel S.K. & Bergman D. (1997) Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, **13**, 383-389
- Wilkinson D.A., Dietrich M., Lebarbenchon C., Jaeger A., Le Rouzic C., Bastien M., Lagadec E., McCoy K.D., Pascalis H., Le Corre M., Dellagi K. & Tortosa P. (2014) Massive Infection of Seabird Ticks with Bacterial Species Related to *Coxiella burnetii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 3327-3333
- Windsor D.A. (2000) Biocartels-units of ecology and evolution based on host-symbiont interrelationships. *Archives of the SciAesthetics Institute*, **1**, 4-12
- Yee T.W. & Wild C.J. (1996) Vector Generalized Additive Models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* **58**, 481-493
- Yodzis P. (1980) The connectance of real ecosystems. *Nature*, **284**, 544-545
- Zhang P., Sandland G.J., Feng Z., Xu D. & Minchella D.J. (2007) Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. *Journal of Theoretical Biology*, **248**, 225-240
- Zuin G., Principi N., Tornaghi R., Paccagnini S., Re M., Massironi E. & Ragni M.C. (1992) Impaired response to hepatitis B vaccine in HIV infected children. *Vaccine*, **10**, 857-860

Chapitre 2

IDENTIFICATION DES ASSOCIATIONS DE PARASITES



Photos de divers parasites respectivement de gauche à droite : *Borrelia burgdorferi* sensu lato, le virus Ebola, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*, *Leishmania tropica*, *Trypanosoma* sp., *Plasmodium falciparum*, *Echinococcus granulosus*, *Babesia* spp., *Rickettsia rickettsii*, le VIH, *Vibrio cholerae*, *Ascaris lumbricoides*.

Le multiparasitisme, et surtout les associations qui en découlent, ont une grande influence sur la dynamique des parasites concernés mais aussi sur celle de leurs hôtes. Dans ce chapitre nous présentons différentes méthodes permettant de détecter les associations multiparasitaires dans les populations d'hôtes. De nombreuses approches sont disponibles pour identifier ces associations. Cependant, les méthodes actuelles montrent certaines limites, et notamment à notre connaissance, aucune de ces approches ne permet de tester statistiquement et précisément lesquels des parasites sont en association au sein des hôtes.

L'objectif de ce chapitre est de développer des méthodes de détection des associations qui puissent être utilisées sur n'importe quels modèles biologiques (*e.g.* faune sauvage, animaux domestiques, hommes, vecteurs). Ces approches peuvent être utilisées lors d'études sur des espèces de parasites ou d'hôtes émergentes ou méconnues, *i.e.* où peu d'informations biologiques sont disponibles. Nous avons choisi de travailler sur des données issues d'études transversales. Les études transversales sont largement utilisées pour détecter la présence de plusieurs parasites au sein d'un hôte. En effet elles sont moins coûteuses en temps et en argent que les études longitudinales. Il était donc important de développer une approche statistique qui puisse s'adapter à ces problématiques, tout en étant informative, pour permettre la poursuite des investigations sur la nature des associations potentiellement détectées (**Article 2**). Ainsi, cette partie de ma thèse a consisté à adapter des méthodes déjà existantes à l'échelle du multiparasitisme. De nombreuses méthodes sont déjà disponibles mais elles se concentrent essentiellement sur les associations deux à deux de parasites. Nous avons choisi d'étudier et d'adapter trois approches connues : celle du chi-deux, des réseaux et du GLM (*i.e.* Modèle Linéaire Généralisé). Nous avons également développé une nouvelle approche – « de screening des associations ». Il s'agit d'une méthode basée sur les probabilités d'occurrences des différentes combinaisons possibles de parasites. Nous avons étudié les propriétés de chacune de ces méthodes (*i.e.* sensibilité et puissance). L'objectif de cette première partie était de pouvoir disposer d'un test statistique fiable pour identifier si les co-occurrences observées étaient dues à des associations de parasites plutôt qu'au hasard. Nous avons mis en évidence que les approches de screening et du chi-deux généralisé avaient les plus fortes puissances. Cependant, aucune des quatre méthodes étudiées n'a permis de faire la différenciation entre des associations dues à des facteurs de risque communs et à de réelles interactions biologiques. Des associations de parasites ont été mises en évidence dans les jeux de données étudiés en particulier dans cet article : 1) dans la population de campagnols agrestes étudiée *Bartonella doshiae* et *Babesia microti* sont associées négativement et 2) dans la population de Sanga nilotiques étudiée *Theileria parva*, *T. mutans* et *T. velifera* sont associées positivement.

D'autres jeux de données, issus de plusieurs collaborations, ont été analysés hors du cadre de cet article.

La nouvelle approche de screening des associations possède un atout supplémentaire vis-à-vis des trois autres. En effet, grâce à elle, il est possible de tester statistiquement et précisément lesquels de ces parasites sont associés au sein des hôtes. À l'ère de la génomique et de l'avènement de nouvelles technologies, il est devenu possible d'identifier, dans les populations d'hôtes, des communautés entières de parasites, ou pathobiomes. Être capable d'identifier statistiquement les parasites qui sont préférentiellement associés est un atout considérable pour accélérer les recherches concernant les potentiels mécanismes d'interactions entre ces parasites.

Article 2

Vaumourin E., Vourc'h G., Telfer S., Lambin X., Salih D.A., Seitzer U., Morand S., Charbonnel N., Vayssier-Taussat M. & Gasqui P. (2014) To Be or Not to Be Associated: Power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**:62

*Les programmes R des fonctions de ces quatre approches de modélisation statistiques sont disponibles en annexe de la thèse (voir **Annexes 2 à 6**).*



To be or not to be associated: power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies

Elise Vaumourin^{1,2*}, Gwenaél Vourc'h¹, Sandra Telfer³, Xavier Lambin³, Diaeldin Salih⁴, Ulrike Seitzer⁵, Serge Morand^{6,7}, Nathalie Charbonnel⁸, Muriel Vayssier-Taussat² and Patrick Gasqui¹

¹ INRA, UR346 Epidémiologie Animale, Saint Genès Champanelle, France

² INRA-Anses-ENVA, USC BIPAR, Maisons-Alfort, France

³ School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

⁴ Department of Ticks and Tick-borne Diseases, Veterinary Research Institute, Khartoum, Sudan

⁵ Division of Veterinary-Infection Biology and Immunology, Research Center Borstel, Borstel, Germany

⁶ Institut des Sciences de l'Évolution (CNRS/IRD / UM2), University of Montpellier 2, Montpellier, France

⁷ Animal et Gestion Intégrée des Risques, CIRAD, Montpellier, France

⁸ INRA, UMR CBGP (INRA / IRD / CIRAD / Montpellier SupAgro), Montpellier, France

Edited by:

Jean François Cosson, National Institute of Agricultural Research, France

Reviewed by:

Valerio Iebba, 'Sapienza' University of Rome, Italy
Bordes Frederic, Institut des Sciences de l'Évolution (ISEM) CNRS, France

*Correspondence:

Elise Vaumourin, UR346 Epidémiologie Animale, INRA, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand – Theix, Route de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France
e-mail: elise.vaumourin@clermont.inra.fr

A growing number of studies are reporting simultaneous infections by parasites in many different hosts. The detection of whether these parasites are significantly associated is important in medicine and epidemiology. Numerous approaches to detect associations are available, but only a few provide statistical tests. Furthermore, they generally test for an overall detection of association and do not identify which parasite is associated with which other one. Here, we developed a new approach, the association screening approach, to detect the overall and the detail of multi-parasite associations. We studied the power of this new approach and of three other known ones (i.e., the generalized chi-square, the network and the multinomial GLM approaches) to identify parasite associations either due to parasite interactions or to confounding factors. We applied these four approaches to detect associations within two populations of multi-infected hosts: (1) rodents infected with *Bartonella* sp., *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophilum* and (2) bovine population infected with *Theileria* sp. and *Babesia* sp. We found that the best power is obtained with the screening model and the generalized chi-square test. The differentiation between associations, which are due to confounding factors and parasite interactions was not possible. The screening approach significantly identified associations between *Bartonella doshiae* and *B. microti*, and between *T. parva*, *T. mutans*, and *T. velifera*. Thus, the screening approach was relevant to test the overall presence of parasite associations and identify the parasite combinations that are significantly over- or under-represented. Unraveling whether the associations are due to real biological interactions or confounding factors should be further investigated. Nevertheless, in the age of genomics and the advent of new technologies, it is a considerable asset to speed up researches focusing on the mechanisms driving interactions between parasites.

Keywords: associations, interactions, modeling, parasite community, screening, GLM approach, network model, chi-square test

INTRODUCTION

A growing number of studies of many mammal hosts, including wild and domestic animals and humans, are reporting simultaneous infections by different microparasites (Cox, 2001; Palacios et al., 2009; Saisongkroh et al., 2009; Tadin et al., 2012; Jacquot et al., 2014), macroparasites (Byrne et al., 2003; Behnke, 2009; Fenton et al., 2010) and both (Jolles et al., 2008; Ezenwa and Jolles, 2011; Nunn et al., 2014). The frequency of co-occurrence can be influenced by interactions between parasites. These interactions are of crucial medical concern because they can alter host susceptibility, infection length and clinical symptoms, as illustrated by the influence of helminths on malaria severity (Nacher, 2002). From an epidemiological point of view, interactions can alter the

risk of transmission. Parasites can interact in a synergistic manner when the presence of one favors the infection by a subsequent parasite, as, for example, HIV and *Mycobacterium tuberculosis* (Corbett et al., 2003). Parasites can also interact in an antagonistic manner, as, for example, in *Aedes aegypti* mosquitoes, where infection with the symbiotic *Wolbachia* prevents subsequent infection with dengue virus, Chikungunya virus and the agent of malaria (Moreira et al., 2009). Parasite interactions have mostly been considered as a one-to-one interaction, where the infection of one parasite influences the acquisition of and/or dynamics of infection by a second parasite. However, interactions between a set of parasites are conceivable where different parasites interact within a network or through “cascade consequence”

(Rigaud et al., 2010; Bordes and Morand, 2011). For instance, such networks have been successfully used to identify interactions in ecology, e.g., El Niño (Trenberth and Fasullo, 2011), in genetics, e.g., HLA genes (Wansen et al., 1997), or in metabolic pathways, e.g., metabolic regulation (Matsuoka and Shimizu, 2012).

The co-occurrence of parasites can also result from confounding factors that create statistical associations between parasites, even though there are no true biological interactions. For instance, similarities in host environment, behavior or susceptibility can cause correlations in the risk of infection between two parasites (e.g., association filters, Combes, 2001). For example, associations in humans between the agent of malaria and helminth infections may be due, in certain contexts, to common social or environmental factors, which can be depicted by a social network analysis, rather than a true biological interaction (Mwangi et al., 2006). Thus, in host populations, interactions between two parasites are suspected when the probability of coinfection is not random once confounding factors have been taken into account.

In population studies, longitudinal or time series data are useful for identifying parasite associations. However, such studies are resource-intensive. In such studies, one can test whether the presence of a parasite impacts the probability of infection by another one (e.g., Mahiane et al., 2010; Sherlock et al., 2013) or one can test whether the infection dynamics of several parasites are correlated (Rohani et al., 2003). One-off cross-sectional studies are widely used to screen for the presence of several parasites because they are less time and money consuming than longitudinal studies. This is especially the case when emerging or poorly known parasites or host species are studied. Numerous approaches are available to detect parasite associations in such contexts. Although a previous study has assessed different approaches to detecting interactions between macroparasites (Fenton et al., 2010), no study has compared the quality (i.e. the probability to wrongly identify association or the power to detect any association) of different approaches for the categorical data (infected, not infected) that is usually available for parasites.

Multivariate analyses (PCA, FCA, DA, CoA) (Gauch, 1982) evaluate which parasites tend to group together. The drawback is that there is usually no statistical test associated with these analyses (but see for example permutation methods, Tollenaere et al., 2008; Salvador et al., 2011). This is an important drawback because statistical tests determine whether the observations depart or not from the null hypothesis (i.e., the fact that the parasites are independent, i.e., not associated). The chi-square test is the most popular and easy test to implement. It is mainly used to study two parasites, but several adaptations have been proposed to study multiple parasites (Holm, 1979; Benjamini and Hochberg, 1995; Janovy et al., 1995). In particular, the chi-square test can be generalized based on the correlation between two qualitative variables, as described by Fahrmeir and Tutz (1994). The main drawback of this approach is that at least five individuals are required per infectious status. Generalized linear models (GLM) are also widely used with multinomial logistic regression (McCullagh and Nelder, 1989; Yee and Wild, 1996; Agresti, 2002). Such approaches can explicitly account for potential confounding factors. Networks have been increasingly used (Bascompte, 2007)

in the last few years in many fields, e.g., in medicine: metabolic pathways (Ravasz et al., 2002; Qin et al., 2012), in computer science: peer to peer networks (Fox, 2001) or in social science: scientific collaboration (Newman, 2004). They also offer an attractive representation of multiple parasite relationships. They provide indices of association such as connectance (Yodzis, 1980), nestedness (Bascompte et al., 2003) or betweenness (Freeman, 1977). However, to date, statistical tests regarding the connectance have rarely been used. All of these approaches have the potential to statistically identify whether there are overall parasite associations within a dataset. However, none statistically identify the specific parasites that are associated. To address this issue, we developed a new approach to study parasite associations, which we called association screening. This approach has the advantage, compared to the others, to detect and statistically test which parasites potentially interact. It is an important pre-requisite for further more precise research focusing on the mechanisms driving any identified interactions, with, for instance, a mechanistic model (e.g., Sherlock et al., 2013; Vaumourin et al., 2013).

The objectives of our study were threefold: (1) to develop a new approach—"association screening"—to statistically test the overall and specific parasite associations within hosts; (2) to compare the "quality" of the new approach and three other known approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies, namely the generalized chi-square test, the network model and the multinomial GLM approach. To do so, we developed a statistical test for the networking and the generalized chi-square approach. Using simulations, we verified that the α risk (i.e., the probability to wrongly detect associations) was well controlled *a priori*. Then, still using simulations, we compared the power (i.e., the probability to detect existing associations) of the four statistical modeling approaches, to identify parasite associations either due to parasite interactions or to confounding factors; (3) to apply these four approaches to detect associations using two datasets of multi-infected hosts. The first one was a population of field voles (*Microtus agrestis*) infected with blood parasites (*Babesia microti*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Bartonella* sp.) (Telfer et al., 2007, 2010). Potential associations between parasites have already been identified for a longitudinal dataset on *M. agrestis* infections obtained from the same study area (Telfer et al., 2010; Sherlock et al., 2013). Here we used an independent cross-sectional dataset (Telfer et al., 2007). Thus, we were able to discuss whether our results were consistent with what was previously found. The second dataset was used to screen associations in a population of bovine infected with *Theileria* sp. and *Babesia* sp. (Salih et al., 2007). To our knowledge, such associations have never been investigated, despite the observations of co-occurrence within vectors (e.g., Ica et al., 2007; García-Sanmartín et al., 2008) and hosts (e.g., Nagore et al., 2004; Altay et al., 2008). Our results should thus underline possible interactions between those parasites.

MATERIALS AND METHODS

FOUR STATISTICAL MODELING APPROACHES

Overall modeling implementation

For each of the models except the generalized chi-square, we constructed a statistical test, which is based on a simulated theoretical distribution of a statistic and its associated confidence

interval under the null hypothesis H_0 that parasite associations are random.

For each model, to estimate the simulated statistic distribution, we simulated NS (Number of Simulations) instances (with $NS \geq 1000$) of a dataset with the same number of parasites (NP), the same observed probability of each i parasite (p_i) and the same total number of hosts (NH). For a given NP, the number of possible parasite combinations NC was calculated as $NC = 2^{NP}$. Parasite combinations are exclusive of one another. The occurrence probability of each NC combination of parasites (Q vector) was calculated as function of $\{p_i, 1 \leq i \leq NP\}$. Under H_0 , we have $Q = \{q_j, 1 \leq j \leq NC\}$ with $q_j = \prod_{i=1}^{NP} \left((p_i)^{1_i} \cdot (1 - p_i)^{1-1_i} \right)$ and indicator $1_i = 1$ if a parasite i was present in a j combination, or 0 otherwise. In each dataset and for each host, under the null hypothesis H_0 , an i parasite is associated at random with a Bernoulli probability distribution with parameter p_i , or a parasite combination is associated at random with a multinomial probability distribution with Q parameter vector. The statistics is evaluated for each simulated dataset. A 95% confidence interval was estimated using the distribution of all simulated statistics.

Similarly, for the observed statistics, the decision criteria (i.e., rejection or not of H_0) and the associated p -value for each of the developed models were obtained with the simulated statistic 95% confidence interval. This method is similar to the bootstrap technique (Efron, 1979; Davison et al., 1986).

All programs used in the analysis were written using R software (version 3.0.1) accessible on the site <http://cran.r-project.org/> (see the name of the packages used below).

Association screening approach

The association screening approach is based on the statistic distribution of the occurrence count of each possible combination of parasites under H_0 . A simulated dataset was an absence/presence matrix with hosts in lines and parasite combinations in columns.

With $NS = 5000$ simulations, we obtained the NC statistic distributions. We estimated a 95% confidence envelope to obtain a profile that includes simultaneously all the combinations. From this profile, we inferred for each combination two quantiles, Q_j^{inf} and Q_j^{sup} , as $P \left\{ \bigcap_{j=1}^{NC} \left\{ Y_j \in [Q_j^{inf}; Q_j^{sup}] \right\} \right\} = 0.95$. A global test was based on the 95% confidence envelope. When H_0 was rejected, the local tests were based on the NC confidence intervals: $[Q_j^{inf}; Q_j^{sup}]$.

We used the *envelope* function from the *boot* package to estimate a 95% confidence envelope for the combination count distribution profile (Davison, 1997) (for more details on implementation see Script 1).

Generalized chi-square approach

The generalized chi-square approach is based on the chi-square distribution, without any simulation step. An observed dataset was an absence/presence matrix with hosts in lines and parasite combinations in columns.

If Y_{obsj} was the number of hosts observed with the parasite combination j , the statistic [CHI2] under H_0 was

defined by: $CHI2 = \sum_{j=1}^{NC_5} (Y_{obsj} - q_j \cdot NH)^2 / (q_j \cdot NH) + \left(\left(\sum_{j=NC_5}^{NC} Y_{obsj} \right) - \left(NH \cdot \sum_{j=NC_5}^{NC} q_j \right) \right)^2 / \left(NH \cdot \sum_{j=NC_5}^{NC} q_j \right)$, with NC_5 the number of combinations where the number of host individual ($q_j \cdot NH$) was superior or equal to 5 (Agresti, 2002). Therefore, the combinations, where the number of individuals was inferior to 5, were merged together. With the generalized chi-square distribution for NC_5 degrees of freedom, the 95% confidence interval was obtained. In the event of rejection of H_0 , it is possible to isolate the combination of parasites which contributed the most to the statistic CHI2 [i.e., with a greater contribution to generalized chi-square than the mean value (χ^2_{obs}/NC)], without this amounting to a real local test (for more details on implementation see Script 2).

Multinomial GLM approach

The multinomial GLM approach is based on the statistic distribution of the residual deviance under H_0 , obtained with a GLM model and a multinomial family (McCullagh and Nelder, 1989). A simulated dataset was an absence/presence matrix with hosts in lines and parasite combinations in columns.

Y_j was the number of hosts with the parasite combination j , the residual deviance under H_0 was defined by: $resDev = -2 \cdot \sum_{j=1}^{NC_1} Y_j \cdot \log(Y_j/NH)$, with NC_1 the number of combinations like Y_j not equal to 0. The number of degrees of freedom associated was defined by: $resddl = (NC_1 - 1) \cdot (NH - 1)$. In the GLM approach, the statistic [GLMC] was defined by: $GLMC = resDev/resddl$. With $NS = 1000$ simulations, we obtained the statistic distribution, and the 95% confidence interval was estimated with the quantiles $Q^{0.025}$ and $Q^{0.975}$.

We used the *vglm* function from the *VGAM* package to realize a multinomial logistic regression model (Yee and Wild, 1996) (for more details on implementation see Script 3).

Network approach

The network approach is based on the statistic distribution of the network connectance under H_0 . The connectance is a structural index (comprised between 0 and 1), which represents the proportion of observed links relative to the number of possible links. It describes the overall complexity of the network (Wasserman and Faust, 1994).

For a given dataset two connectance results were obtained: the network connectance for host individuals in relation to parasites [PNWC] (i.e., two hosts were connected if they shared the same parasite) or in relation to parasite combinations [CNWC] (i.e., two hosts were connected if they shared the same parasite combination). A simulated dataset was an absence/presence matrix with hosts in lines and parasites or parasite combinations in columns. We chose to work on both, parasite and combination networks because parasite networks are usually performed whereas combination network is directly comparable to the other approaches studied here.

In the case of parasite combinations, with Y_j the host number with the parasite combination j , the combination network connectance statistics was defined by: $CNWC = \sum_{j=1}^{NC} ((Y_j \cdot (Y_j - 1)) / (NH \cdot (NH - 1)))$. The parasite

network connectance statistics was defined by: $PNWC = \sum_{k=2}^{k=NH} \left(\sum_{l=1}^{l=k-1} (1_l^k / (NH \cdot (NH - 1)/2)) \right)$, with indicator $1_l^k = 1$ if the host individuals k and l had at least one common parasite, or 0 otherwise. With $NS = 1000$ simulations, we obtained two statistic distributions, and the two 95% confidence interval estimated with, in each case, the quantiles $Q^{0.025}$ and $Q^{0.975}$.

Graphical representations of the structuring of hosts and parasites were realized using respectively the projections of hosts and parasites of a parasite network approach. However we did not study the associated statistics connectance because it is not informative given the low number of parasites.

We used the *igraph* package, in particular the *graph.density* connectance function (Csárdi and Nepusz, 2006) (for more details on implementation see Script 4).

SENSITIVITY STUDIES OF THE MODELING APPROACHES

For each model, we first checked whether the α risk, i.e., the risk to conclude that the association (alternative hypothesis H_1) is significant when in fact the association was random (null hypothesis H_0), defined *a priori*, was close to 0.05.

Next, we performed NS simulations ($NS = 1000$) of a dataset under the null hypothesis H_0 . The estimated α was the frequency of rejecting H_0 using these new NS simulations.

To perform these sensitivity studies, we considered that the parasites were not associated, i.e., H_0 hypothesis. The population size was 1000 hosts. Below, we also studied a smaller population of 500 individual hosts for the power studies. 1000 and 500 are reasonable numbers of hosts to have in a field study. The number of parasites varied from two to eight, which gave 256 combinations (i.e., <500 hosts). We did not study higher numbers of parasites because we need to keep the number of combinations below that of hosts. Parasite prevalences were uniformly distributed between 0.10 and 0.60, this interval was wide enough to give a trend. We performed the simulations for 7 levels of NP (i.e., 7 levels of the simulation scheme as NH was held at 1000).

Power studies of the modeling approaches

For each model we evaluated the β risk, corresponding to the probability of concluding that the association was random (H_0) when there was association (H_1). Then, the power was evaluated by $(1 - \beta)$ which is the capacity to accept H_1 under hypothesis H_1 .

For each model, we performed NS simulations ($NS = 1000$) of a dataset under the null hypothesis H_1 . The estimated $(1 - \beta)$ was the frequency with which H_0 was rejected with the new NS simulations.

The ideal approach to detect biological parasite interactions would be an approach that would be able to detect parasite association, except in the case of confounding factors. We considered here that confounding factors structure host populations into subpopulations that have different levels of parasite prevalence. To mimic this, we created subpopulations that have different sizes and parasite prevalence. We independently generated parasite occurrence. Therefore, there was no parasite association within each subpopulation. Thus, we constructed two H_1 hypotheses. The first one is that host populations are structured (H_{1h}) but not

parasites (H_{0p}). The second H_1 hypothesis is that parasites are biologically associated (H_{1p}) and host populations are not structured (H_{0h}). Thus, we checked whether different statistics were specific to each hypothesis, i.e., powerful statistics to detect host population structure only, and other statistics that detect parasite structure only.

In all cases, we studied two sizes of the general host population (i.e., a large population $NH = 1000$ or a small population $NH = 500$) and up to eight parasites (i.e., 256 combinations). Parasite prevalences were uniformly distributed between 0.10 and 0.60.

In the case of the hypothesis of host structuring (H_{1h}) without parasite structuring (H_{0p}), host subpopulations differed both by their sizes and by the prevalences of their parasites. Four sets of two host subpopulations were tested, with the ratio between the sizes of the two subpopulations set at 0.2 (i.e., strong imbalance in size between the two subpopulations, e.g., for a general population where $NH = 1000$, subpopulation 1: $NH_1 = 200$ and subpopulation 2: $NH_2 = 800$), 0.3, 0.4 or 0.5 (i.e., balance in size between the two subpopulations, e.g., for a general population where $NH = 1000$, subpopulation 1: $NH_1 = 500$ and subpopulation 2: $NH_2 = 500$). The parasite prevalence ratio within the first subpopulation was either 0.5 or 1.5 times the prevalence found under H_{0h} . Parasite prevalence within the second subpopulation is defined so that the overall parasite prevalence is equal to those defined under H_{0h} . Thus, the parasite prevalences within the first subpopulation were respectively lower or higher than the second subpopulation, e.g., for a general population where the prevalence of parasite 1 was 0.10%, it was, for the subpopulation 1, respectively 0.05 or 0.15%, and the opposite for the subpopulation 2. We obtained 112 levels for the simulation scheme, i.e., 2 levels of $NH * 7$ levels of $NP * 2$ levels of parasite prevalence ratios * 4 levels of subpopulation size ratios.

In the case of the hypothesis parasite structuring (H_{1p}) without host structuring (H_{0h}), we defined four correlation levels between the two parasites that had the two highest prevalences, so that the overall parasite prevalences are the same as under H_{0p} hypothesis. The other parasites were not correlated. The correlation between the two parasites of prevalence p_1 and p_2 under H_{0p} , was defined (Fahrmeir and Tutz, 1994) by: $cor(y_1, y_2) = [P(y_1 = y_2 = 1) - p_1 \cdot p_2] / [p_1 \cdot (1 - p_1) \cdot p_2 \cdot (1 - p_2)]^{1/2}$. Thus, to obtain the prevalence p_1 and p_2 under H_{0p} , the studied correlations were fixed to four values: $min(cor)$, $min(cor)/2$, $max(cor)/2$ and $max(cor)$, with $min(cor) = max(-1; a; 1/a)$ and $max(cor) = min(1; b; c; ((1/d) - (1/a)))$. The constraints a , b , c and d were function to p_1 and p_2 : $a = [p_1 \cdot p_2 / ((1 - p_1) \cdot (1 - p_2))]^{1/2}$, $b = [p_2 \cdot (1 - p_1) / (p_1 \cdot (1 - p_2))]^{1/2}$, $c = [p_1 \cdot (1 - p_2) / (p_2 \cdot (1 - p_1))]^{1/2}$ and $d = [p_1 \cdot (1 - p_1) \cdot p_2 \cdot (1 - p_2)]^{1/2}$. We obtained 56 levels for the simulation scheme, i.e., 2 levels of $NH * 7$ levels of $NP * 4$ levels of correlations.

Case studies: association studies in two populations infected by multiple parasites

We applied these four models to detect associations within two datasets of multi-infected hosts (Salih et al., 2007; Telfer et al., 2007, 2010). The first dataset was composed of 887 field voles

(*Microtus agrestis*), sampled from 27 sites in the United Kingdom biannually between 2001 and 2004. Among field voles, 23 were infected by BGA (an unidentified *Bartonella* species) (2.6%), 137 by *B. doshiae* (15.4%), 105 by *B. grahamii* (11.8%), 186 by *B. taylorii* (20.9%), 305 by *Babesia microti* (34.4%) and 36 by *Anaplasma phagocytophilum* (4.1%) (for more information on the sampling and *Bartonella* diagnostic assays see Telfer et al., 2007; for more information on the diagnostics for *B. microti* and *A. phagocytophilum* see Telfer et al., 2010).

The second dataset was composed of 600 cattle (local Zebu, long-horned Nilotic type of cattle), sampled in Sudan in 2005. Among them, 427 were infected by *Theileria parva* (71%), 436 by *T. mutans* (73%), 272 by *T. velifera* (45%), 16 by *T. taurotragis* (2.7%), 3 by *T. buffeli* (0.5%), 1 by *T. annulata* (0.2%), 10 by *Babesia bovis* (1.7%) and 2 by *B. bigemina* (0.3%) (for more information see Salih et al., 2007).

RESULTS

SENSITIVITY STUDIES OF THE MODELING APPROACHES

For all approaches, α risk had equal (generalized chi-square test, network approaches and multinomial GLM model) or lower (association screening model) to 0.05% as expected (Figure 1).

POWER STUDIES OF THE MODELING APPROACHES

Host structuring (H1h) without parasite structuring (H0p)

In the case of $NH = 1000$ and for both ratios of prevalence levels, the two best models were the association screening and the generalized chi-square (Figure 2, Annex 1). On the contrary, the least powerful approach, whatever conditions, was the GLM model

(Figure 2). For all approaches, except the GLM, we observed that the power increased with increasing number of parasites. Thus, our ability to reveal a subpopulation structure in the case where only two parasites are studied was very poor. The power was higher when the number of host individuals in the two subpopulations was similar.

The same trends were observed for the smaller host population size ($NH = 500$), but power was moderately lower (see Annexes 2 and 3).

Parasite structuring (H1p) without host structuring (H0h)

In the case of weak correlations, either for positive correlations (Figure 3) or negative correlations (Annex 4), the generalized chi-square and the screening approaches were the most powerful ones. However, the power of the screening approach decreased when the number of parasites was high (>7). The other approaches had very poor power for two parasites (<0.1). Compared with the network models, GLM had a poor power when the number of parasites exceeded four parasites.

For strong parasite correlations, either for the positive correlation study (Figure 4) or the negative correlation study (Annex 5), all approaches had a good power (>0.7), except the parasite network for two parasites (<0.06).

Finally, the same trends were observed for smaller host population size ($NH = 500$). Power estimates were moderately lower (for weak correlations see Annexes 6A and 6B and for strong correlations see Annexes 7A and 7B).

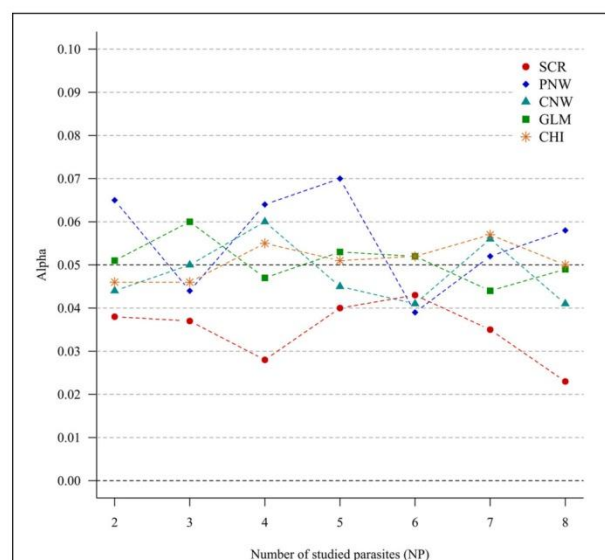


FIGURE 1 | Simulation outputs relative to the test of the sensitivity (α) for the four approaches. CHI, generalized chi-square test; PNW, parasite network model; CNW, combination network model; GLM, multinomial GLM model and SCR, the association screening approach. The number of parasites varied from two to eight, the size of the total host population was fixed to 1000.

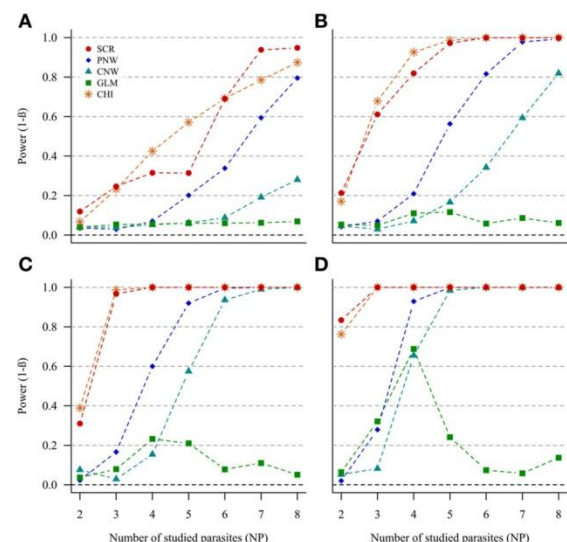
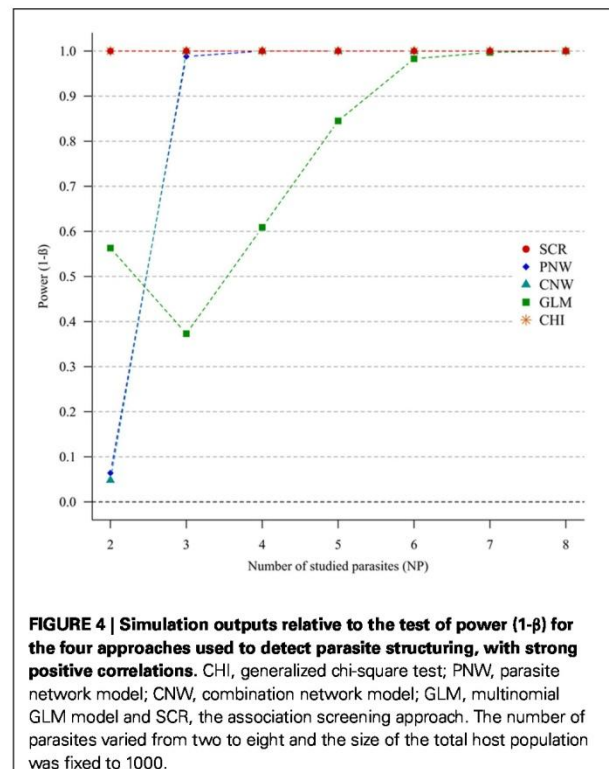
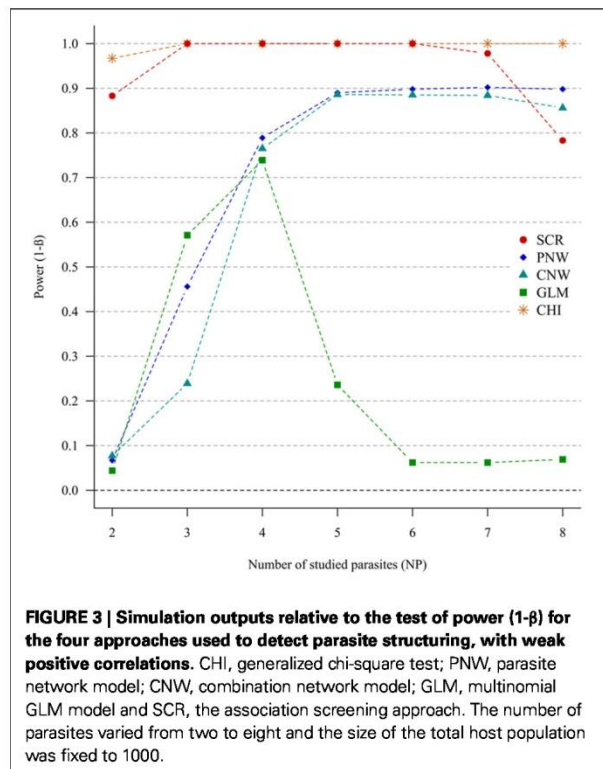


FIGURE 2 | Simulation outputs relative to the test of power ($1-\beta$) for the four approaches used to detect host structuring, with a prevalence ratio equal to 0.5. CHI, generalized chi-square test; PNW, parasite network model; CNW, combination network model; GLM, multinomial GLM model and SCR, the association screening approach. The number of parasites varied from two to eight, the size of the total host population was fixed to 1000 and the ratios of host subpopulation sizes varied (A) 0.2. (B) 0.3. (C) 0.4. (D) 0.5.



CASE STUDIES: ASSOCIATION STUDIES IN TWO POPULATIONS INFECTED BY MULTIPLE PARASITES

Microtus agrestis population with multi-infected hosts

All approaches, except the parasite network model (observed connectance: 0.197, p -value: 0.530), revealed a significant overall parasite association within the 887 field voles: observed connectance of host individuals was equal to 0.170 and significant (p -value: 0.034) for the combination network, observed residual deviance was equal to 0.179 and significant (p -value: 0.002) for the GLM, observed generalized chi-square was equal to 111.08 with 16 degrees of freedom and significant (p -value < 0.001) and also for the association screening model (p -value < 0.001).

Five parasite combinations were significant when subjected to the screening analysis, among which only one depicted parasite association: the association of *B. doshiae* and *Babesia microti* was underrepresented compared to expected (p -value < 0.001). The four other combinations were combinations where host individuals were infected by one and only one parasite. Infections by *B. doshiae* (p -value < 0.001), *B. grahamii* (p -value < 0.001) and *Babesia microti* on their own were all over-represented compared to expected (p -value < 0.001). Finally, the number of non-infected individuals was underrepresented compared to expected (p -value < 0.001).

Bovine population with multi-infected hosts

All approaches, except the GLM model (observed residual deviance: 0.186, p -value: 0.776), revealed a significant overall parasite association within the 600 cattle: observed connectance of

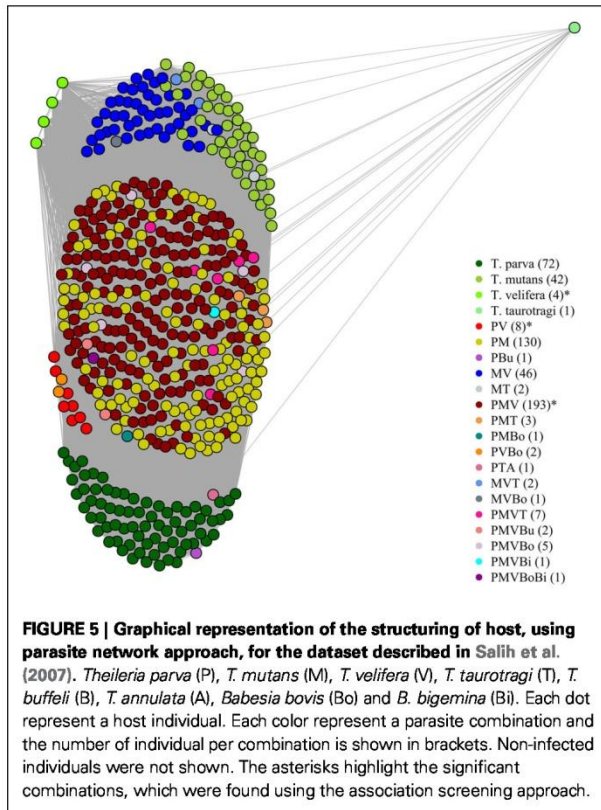
host individuals was equal to 0.716 and significant (p -value < 0.001) for the parasite network, observed connectance of host individuals was equal to 0.190 and significant (p -value < 0.001) for the combination network, observed generalized chi-square was equal to 196.94 with 8 degrees of freedom and significant (p -value < 0.001) and also for the association screening model (p -value < 0.001).

Four parasite combinations were found significant using the screening analysis, among which two depicted parasite associations: individuals infected by *T. parva*, *T. mutans* and *T. velifera*, were significantly over-represented (p -value < 0.001). Those infected by *T. parva* and *T. velifera* were significantly underrepresented (p -value < 0.001). Individuals infected by *T. velifera* were underrepresented compared to expected (p -value < 0.001). Finally, there were less non-infected individuals than expected (p -value < 0.001).

On the graphical representations of the structuring of hosts we noted that individual hosts were divided in six main groups, two of which were associations detected with the screening approach (Figure 5). Graphical representations of the structuring of parasites highlight the three most prevalent parasite which were significant with the screening approach (Figure 6).

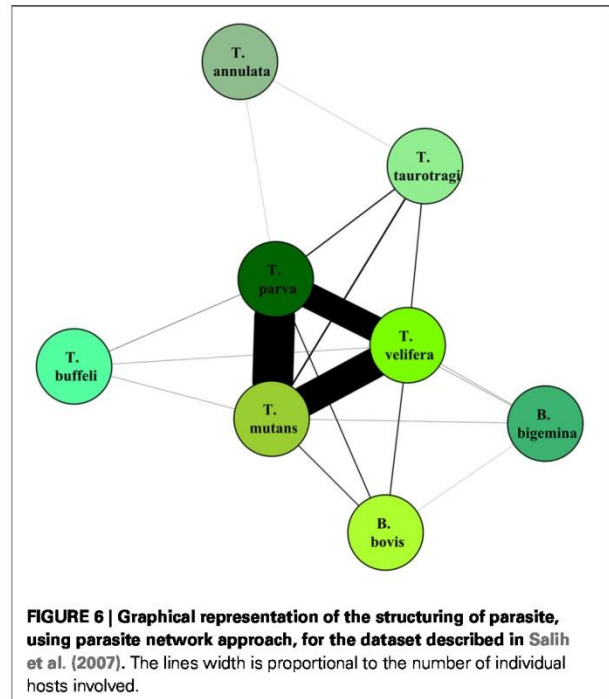
DISCUSSION

In the age of genomics and the advent of new technologies (e.g., high-throughput sequencing), it has become possible to identify intra-host parasite communities (e.g., Cheval et al., 2011; Vayssier-Taussat et al., 2013). Being able to statistically identify



parasites that are associated is a considerable asset to speed up research focusing on the mechanisms driving interactions between parasites. Here we proposed a new powerful approach (“association screening”) to test the overall presence of parasite associations and identify the parasite combinations that are significantly over- or under-represented. The screening approach and the generalized chi-square test appeared to be the most suitable models to detect the presence of parasite associations. The main advantage of the screening approach is that significant parasite combinations can be statistically identified, in addition to knowing whether parasites are overall associated. To our knowledge, this is the only approach identifying precise parasite combinations in the case of multiple infections in cross-sectional studies.

Both, the parasite screening and the generalized chi-square approaches were also very powerful to detect parasite associations due to the presence of subpopulations. Thus, the differentiation between associations, which are due to confounding factors (which structure host populations into subpopulations) and parasite interactions was not possible. This differentiation was also not possible with the multinomial GLM and network models. To counter this problem, if the influence of a factor in the observed associations is suspected, this factor should be taken into account. For screening model, network approaches and generalized chi-square model, the dataset should be divided into different subpopulations according to the factor levels. The



presence of parasite associations should then be tested within each subpopulation. The drawback of this strategy is that multiple statistical tests are used, increasing the alpha risk (Agresti, 2002). Contrary to these approaches the impact of potential confounding factors can be directly tested using a GLM model. However, it is also the least powerful of the approaches tested to identify structures of host and parasite populations. In any case, factors can only be tested when they are measured (e.g., Bajer et al., 2001; Pawelczyk et al., 2004). These results highlight the limits of exploratory approaches, emphasizing that conclusions should be further tested by other approaches such as longitudinal or experimental studies. For instance, for intestinal viruses that were found to be more prevalent in the presence of particular intestinal bacteria (Kuss et al., 2011; Pennisi, 2011), further experimental studies both confirmed this result and identified the mechanisms driving this interaction (Kane et al., 2011).

In the last few years, the use of network analysis has grown impressively (Bascompte, 2007; Poisot et al., 2012) as they give attractive graphical representations, can be used on big datasets and mimic ecological pathways (e.g., parasite transmission in Godfrey, 2013). Network analyses have been used in community ecology studies of interacting species (e.g., pollinators, parasites, Poulin, 2010) or to identify “hub” individuals, which contribute the most to parasite spread (for instance in a lizard population in Fenner et al., 2011). Therefore, within a given population, links between vertices were randomly generated to identify vertices that have more or less connection than expected. Here, we worked on networks with two types of populations (hosts and parasites). We randomly generated links between the two populations, i.e., parasites or combinations and hosts. Two hosts

were associated when they had either at least one parasite in common (for the parasite network) or a unique similar combination (because the different combinations are exclusive). We found that both network approaches had rather good power, although less than the generalized chi-square and screening approaches, suggesting the need to explore more deeply some properties of networks (such as modularity) linked to parasite co-occurrences. Moreover, networks remain interesting for graphic representation of links between both parasite and hosts (e.g., Boutin et al., 2013).

Increasing the population size of hosts enhanced, as expected, the power of all tests. However, in real life, one should make sure that the number of hosts is at least greater than the number of combinations. Regarding the generalized chi-square approach, the main drawback is the requirement of a minimum number of five individuals for each possible combination of infections (Agresti, 2002), forcing that include less than five individuals to be merged. This loss of information can potentially mask putative association signals. Similarly, the multinomial GLM removes combinations without any hosts. In doing so, the number of degrees of freedom is decreased. This explains the low power of the multinomial GLM compared to the other approaches. For the generalized chi-square, as the combinations with less than 5 hosts were pooled, this maintains a certain stability in the sample size, and therefore, limits the power loss. The strength of host structuring, i.e., differences in prevalence and sample sizes between subpopulations, had an impact on the ability of approaches to detect a structure. The more the subpopulations were balanced in sample size, the better the structure of hosts could be identified. For both host structured and parasite structured simulations, we observed that there was generally a maximum of power in relation to the number of parasites. Indeed, the power first increased with the number of parasites. This is because the number of combinations also increases, and, therefore, there is more available information to discriminate between groups of individuals. For some approaches, at high numbers of parasites, the power decreased. This is due to the fact that the number of combinations is too high compared the number of hosts. In addition, we found that the power was better when parasites were strongly associated.

The α risk (or the type one error) was tightly controlled for all approaches, i.e., all approaches minimized the risk of concluding that the presence of associations was significant when in fact the presence of associations was random. This was true even for increased numbers of studied parasites (Figure 1). The association screening model, with an α risk of 0.04%, was a more conservative test than the others approaches. So when the screening approach detects structure in the host population, there is a strong chance that it is real.

The four approaches presented here can be conducted without any *a priori* biological knowledge. Thus, it is important to interpret results in light of current knowledge of the biology of studied parasites. It is also critical to remember that there is a risk in using all these four methods on the same dataset (i.e., problem of multiple tests, Bland and Altman, 1995; Agresti, 2002). Ideally, only one method should be used. If the aim of the analysis is to investigate in the first instance the associations, and then to go further in a second step (e.g., interaction study), the association screening approach is the most suitable.

Concerning the *M. agrestis* dataset, a significant parasite association was detected by all approaches except the parasite network. The screening approach found that *B. doshiae* (15.4%) and *B. microti* (34.4%) were negatively associated. Thus, we were examining a case of six studied parasites with a negative correlation. In the power study of strong negative correlation for six parasites, all approaches had a good power (Annex 5). The network approach may not have been significant in the field study due to the fact that our power study examined only correlations between parasites at 10 and 60% prevalence. The negative association between *B. doshiae* and *B. microti* corroborates previous findings from analyses of a longitudinal dataset from the same study system of Telfer et al. (2010) and Sherlock et al. (2013). Telfer et al. (2010) found that *B. microti* was negatively associated with *Bartonella* spp. and *vice versa*. Unlike here, they also detected that *A. phagocytophilum* was associated with *Bartonella* spp. and *B. microti*. In a Bayesian analysis of a smaller subset of the longitudinal dataset that had information on *Bartonella* species identity, Sherlock et al. (2013) found negative associations between *B. microti* and the three *Bartonella* species, *B. doshiae*, *B. taylorii*, and *B. grahamii*. The longitudinal nature of the datasets allowed these studies to analyse the impact of current and previous exposure (Telfer et al., 2010), or simply previous exposure (Sherlock et al., 2013), on the probability of infection and, in the case of Sherlock et al. (2013), the probabilities of recovery and reinfection. Clearly, this is not possible with a simple model of associations as in the screening model or with the three other studied approaches. In addition, both the longitudinal studies considered more individuals and captures (>5900 individuals and >14000 captures for Telfer et al., 2010; >1800 individuals and >4300 captures for Sherlock et al., 2013), and used GLM approaches to account for potentially confounding variables such as weight, sex and season. As infection probabilities for all the parasites included in this dataset have been shown to vary by such variables (Telfer et al., 2007, 2010), structuring of the host population may mask or enhance the associations identified using the cross-sectional approaches considered in this study and this, or increases sample size, could explain the observed differences between the current study and their findings. This highlights the need to consider confounding variables prior to conducting association analyses for hosts from wild populations. The mechanism behind the antagonistic interaction between *B. microti* and *Bartonella* spp. is unknown, but could be related to competition for host resources (both parasites infect erythrocytes) or cross-effective immune responses.

For the bovine dataset (Salih et al., 2007), all approaches except the GLM model, identified a significant parasite association in the bovine population. This seemed to be consistent with the power study, in the majority of cases studied, the GLM approach was the least powerful. The screening approach found that *T. parva*, *T. mutans*, and *T. velifera* were positively associated, whilst *T. parva* and *T. velifera*, were negatively associated. Apart from the fact that confounding factors are also unknown, to date the possible biological reasons for these associations can only be speculated on. Possible associations can be due to association found in vectors. Indeed *T. mutans* and *T. velifera* are both vectorised by *Amblyomma* spp. (Anonymous, 1983; Sugimoto and Fujisaki,

2002; Salih et al., 2008). Another explanation for significant associations could be that *T. parva*, which is pathogenic, would modify the host susceptibility for *T. mutans* and *T. velifera*, which are both benign infections (Uilenberg, 1981; Sugimoto and Fujisaki, 2002).

After identifying potential associations within a parasite community, the potential interactions between the parasites can be studied. A mechanistic model was developed to study more precisely the relationships between *B. microti*, *A. phagocytophilum*, and *Bartonella* sp. in *M. agrestis* (Sherlock et al., 2013). In the same way, it would be interesting to implement a mechanistic model to better understand the relationships between *Theileria* species in cattle.

One major advance would be to incorporate potentially confounding factors for the generalized chi-square and screening approaches. This has already been achieved for the chi-square test that tested two by two parasite association (Hellard et al., 2012). Hellard et al. have integrated confounding factors linked to the prevalence of parasites. Similarly, this could be implemented into the screening approach. Network analyses are also particularly promising for studying and representing parasite association, although more investigations are needed using both real and simulated data (Poisot et al., 2012, 2013).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Analyzed the data: Elise Vaumourin and Patrick Gasqui. Contributed analysis tools: Patrick Gasqui and Elise Vaumourin. Wrote the paper: Elise Vaumourin, Patrick Gasqui, Gwenaél Vourc'h, Muriel Vayssier-Taussat, Sandra Telfer, Serge Morand, and Nathalie Charbonnel. Supervised the work: Patrick Gasqui, Gwenaél Vourc'h, and Muriel Vayssier-Taussat. Designed and performed the field work: Sandra Telfer, Xavier Lambin, Diaeldin Salih, and Ulrike Seitzer.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the « Tiques et Maladies à Tiques » working group of the « Réseau Ecologie des Interactions Durables » for discussion and support. This modeling work was supported by the Animal Health department of National Institute of Agronomic Research (<http://www.inra.fr>), Auvergne region (<http://www.auvergnesciences.com>), the Metaprogramme MEM (projet Patho-ID) of INRA and the EU grant FP7-261504 EDENext. It is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext208 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The field vole fieldwork was supported by funding from the Natural Environment Research Council (grant GR3/13051) and the Wellcome Trust (grants 075202/Z/04/Z and 070675/Z/03/Z). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fcimb.2014.00062/abstract>

REFERENCES

- Agresti, A. (2002). *Categorical Data Analysis*. Hoboken; New Jersey, NJ: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/0471249688
- Altay, K., Aydin, M. F., Dumanli, N., and Aktas, M. (2008). Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 158, 295–301. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.025
- Anonymous. (1983). *Tick and Tick-Borne Disease Control. The Sudan: Studies on Important Tick-Borne Diseases of Cattle*. AG: GCP/SUD/024/DEN. Technical Report 2. Rome: Food and Agricultural Organization.
- Bajer, A., Pawelczyk, A., Behnke, J., Gilbert, F., and Sinski, E. (2001). Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 122, 43–54. doi: 10.1017/S0031182000007058
- Bascompte, J. (2007). Networks in ecology. *Basic Appl. Ecol.* 8, 485–490. doi: 10.1016/j.baec.2007.06.003
- Bascompte, J., Jordano, P., Melian, C. J., and Olesen, J. M. (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9383–9387. doi: 10.1073/pnas.1633576100
- Behnke, J. (2009). Detecting interactions between parasites in cross-sectional studies of wild rodent populations. *Wiad. Parazytol.* 55, 305–314.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300.
- Bland, J. M., and Altman, D. G. (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *Br. Med. J.* 310, 170. doi: 10.1136/bmj.310.6973.170
- Bordes, F., and Morand, S. (2011). The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 1:7346. doi: 10.3402/iee.v1i0.7346
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., and Derome, N. (2013). Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLoS ONE* 8:e84772. doi: 10.1371/journal.pone.0084772
- Byrne, C. J., Holland, C. V., Kennedy, C. R., and Poole, W. R. (2003). Interspecific interactions between *Acanthocephala* in the intestine of brown trout: are they more frequent in Ireland? *Parasitology* 127, 399–409. doi: 10.1017/S0031182003003846
- Cheval, J., Sauvage, V., Frangeul, L., Dacheux, L., Guigon, G., Dumey, N., et al. (2011). Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3268–3275. doi: 10.1128/JCM.00850-11
- Combes, C. (2001). *Parasitism*. University of Chicago Press.
- Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Raviglione, M. C., et al. (2003). The growing burden of tuberculosis global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Intern. Med.* 163, 1009–1021. doi: 10.1001/archinte.163.9.1009
- Cox, F. E. G. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122, S23–S38. doi: 10.1017/S003118200001698x
- Csárdi, G., and Nepusz, T. (2006). *The igraph Software Package for Complex Network Research. InterJournal Complex Systems* 1695.
- Davison, A. C. (1997). *Bootstrap Methods and Their Application*. New York, NY: Cambridge university press. doi: 10.1017/CBO9780511802843
- Davison, A. C., Hinkley, D. V., and Schechtman, E. (1986). Efficient bootstrap simulation. *Biometrika* 73, 555–566. doi: 10.2307/2336519
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann. Stat.* 7, 1–26. doi: 10.1214/aos/1176344552
- Ezenwa, V. O., and Jolles, A. E. (2011). From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integr. Comp. Biol.* 51, 540–551. doi: 10.1093/icb/ict058
- Fahrmeir, L., and Tutz, G. (1994). *Multivariate Statistical Modelling Based on Generalized Linear Models*. New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-4899-0010-4
- Fenner, A. L., Godfrey, S. S., and Michael Bull, C. (2011). Using social networks to deduce whether residents or dispersers spread parasites in a lizard population. *J. Anim. Ecol.* 80, 835–843. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01825.x
- Fenton, A., Viney, M. E., and Lello, J. (2010). Detecting interspecific macroparasite interactions from ecological data: patterns and process. *Ecol. Lett.* 13, 606–615. doi: 10.1111/j.1461-0248.2010.01458.x
- Fox, G. (2001). Peer to Peer Networks. *Comput. Sci. Eng.* 3, 75–77. doi: 10.1109/5992.919270
- Freeman, L. C. (1977). A set of measures of centrality based on betweenness. *Sociometry* 40, 35–41. doi: 10.2307/3033543

- García-Sanmartín, J., Barandika, J. F., Juste, R. A., García-Pérez, A. L., and Hurtado, A. (2008). Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. *Med. Vet. Entomol.* 22, 318–325. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00748.x
- Gauch, H. G. (1982). *Multivariate Analysis in Community Ecology*. New York, NY: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511623332
- Godfrey, S. S. (2013). Networks and the ecology of parasite transmission: a framework for wildlife parasitology. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2, 235–245. doi: 10.1016/j.ijppaw.2013.09.001
- Hellard, E., Pontier, D., Sauvage, F., Poulet, H., and Fouchet, D. (2012). True versus false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses. *PLoS ONE* 7:e29618. doi: 10.1371/journal.pone.0029618
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 6, 65–70.
- Ica, A., Vatansever, Z., Yildirim, A., Duzlu, O., and Inci, A. (2007). Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. *Vet. Parasitol.* 148, 156–160. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.003
- Jacquot, M., Bisseux, M., Abrial, D., Marsot, M., Ferquel, E., Chapuis, J.-L., et al. (2014). High-throughput sequence typing reveals genetic differentiation and host specialization among populations of the *Borrelia burgdorferi* species complex that infect rodents. *PLoS ONE* 9:e88581. doi: 10.1371/journal.pone.0088581
- Janovy, J. J., Clopton, R. E., Clopton, D. A., Synder, S. D., Efting, A., and Krebs, L. (1995). Species density distributions as null models for ecological significant interactions of parasite species in an assemblage. *Ecol. Modell.* 77, 189–196. doi: 10.1016/0304-3800(93)E0087-J
- Jolles, A. E., Ezenwa, V. O., Etienne, R. S., Turner, W. C., and Olff, H. (2008). Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* 89, 2239–2250. doi: 10.1890/07-0995.1
- Kane, M., Case, L. K., Kopaskie, K., Kozlova, A., Macdearmid, C., Chervonsky, A. V., et al. (2011). Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science* 334, 245–249. doi: 10.1126/science.1210718
- Kuss, S. K., Best, G. T., Etheredge, C. A., Pruijssers, A. J., Frierson, J. M., Hooper, L. V., et al. (2011). Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science* 334, 249–252. doi: 10.1126/science.1211057
- Mahiane, S. G., Ndong Nguéma, E.-P., Pretorius, C., and Auvert, B. (2010). Mathematical models for coinfection by two sexually transmitted agents: the human immunodeficiency virus and herpes simplex virus type 2 case. *J. R. Stat. Soc. C* 59, 547–572. doi: 10.1111/j.1467-9876.2010.00719.x
- Matsuoka, Y., and Shimizu, K. (2012). Importance of understanding the main metabolic regulation in response to the specific pathway mutation for metabolic engineering of *Escherichia coli*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3:e201210018. doi: 10.5936/csbj.201210018
- McCullagh, P., and Nelder, J. A. (1989). *Generalized Linear Models*. New York, NY: Chapman & Hall/CRC. doi: 10.1007/978-1-4899-3242-6
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., et al. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139, 1268–1278. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042
- Mwangi, T. W., Bethony, J., and Brooker, S. (2006). Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100, 551–570. doi: 10.1179/136485906X118468
- Nacher, M. (2002). Worms and malaria: noisy nuisances and silent benefits. *Parasite Immunol.* 24, 391–393. doi: 10.1046/j.1365-3024.2002.00470.x
- Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A. L., Juste, R. A., and Hurtado, A. (2004). Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int. J. Parasitol.* 34, 1059–1067. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.05.008
- Newman, M. E. (2004). Coauthorship networks and patterns of scientific collaboration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(Suppl. 1), 5200–5205. doi: 10.1073/pnas.0307545100
- Nunn, C. L., Brezine, C., Jolles, A. E., and Ezenwa, V. O. (2014). Interactions between micro- and macroparasites predict microparasite species richness across primates. *Am. Nat.* 183, 494–505. doi: 10.1086/675362
- Palacios, G., Hornig, M., Cisterna, D., Savji, N., Bussetti, A. V., Kapoor, V., et al. (2009). *Streptococcus pneumoniae* Coinfection Is Correlated with the Severity of H1N1 Pandemic Influenza. *PLoS ONE* 4:e8540. doi: 10.1371/journal.pone.0008540
- Pawelczyk, A., Bajer, A., Behnke, J. M., Gilbert, F. S., and Sinski, E. (2004). Factors affecting the component community structure of haemoparasites in common voles (*Microtus arvalis*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol. Res.* 92, 270–284. doi: 10.1007/s00436-003-1040-1
- Pennisi, E. (2011). Gut bacteria lend a molecular hand to viruses. *Science* 334, 168. doi: 10.1126/science.334.6053.168
- Poisot, T., Canard, E., Mouillot, D., Mouquet, N., Gravel, D., and Jordan, F. (2012). The dissimilarity of species interaction networks. *Ecol. Lett.* 15, 1353–1361. doi: 10.1111/ele.12002
- Poisot, T., Stanko, M., Miklisova, D., and Morand, S. (2013). Facultative and obligate parasite communities exhibit different network properties. *Parasitology* 140, 1340–1345. doi: 10.1017/S0031182013000851
- Poulin, R. (2010). Network analysis shining light on parasite ecology and diversity. *Trends Parasitol.* 26, 492–498. doi: 10.1016/j.pt.2010.05.008
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60. doi: 10.1038/nature11450
- Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., and Barabási, A. L. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* 297, 1551–1555. doi: 10.1126/science.1073374
- Rigaud, T., Perrot-Minnot, M. J., and Brown, M. J. (2010). Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *J. R. Stat. Soc. B* 277, 3693–3702. doi: 10.1098/rspb.2010.1163
- Rohani, P., Green, C., Mantilla-Beniers, N., and Grenfell, B. (2003). Ecological interference between fatal diseases. *Nature* 422, 885–888. doi: 10.1038/nature01542
- Saisongkroh, W., Rolain, J.-M., Suputtamongkol, Y., and Raoult, D. (2009). Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J. Med. Assoc. Thai.* 92, 707–731.
- Salih, D. A., El Hussein, A. M., Seitzer, U., and Ahmed, J. S. (2007). Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol. Res.* 101, 1035–1044. doi: 10.1007/s00436-007-0583-y
- Salih, D. A., Julla, I. I., Hassan, S. M., El Hussein, A. M., and Jongejan, F. (2008). Preliminary survey of ticks (Acari: Ixodidae) on cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75, 47–53. doi: 10.4102/ojvr.v75i1.87
- Salvador, A. R., Guivier, E., Xuereb, A., Chaval, Y., Cadet, P., Poule, M. L., et al. (2011). Concomitant influence of helminth infection and landscape on the distribution of Puumala hantavirus in its reservoir, *Myodes glareolus*. *BMC Microbiol.* 11:30. doi: 10.1186/1471-2180-11-30
- Sherlock, C., Xifara, T., Telfer, S., and Begon, M. (2013). A coupled hidden Markov model for disease interactions. *J. R. Stat. Soc. C* 62, 609–627. doi: 10.1111/rssc.12015
- Sugimoto, C., and Fujisaki, K. (2002). “Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants” in *Theileria*, eds D. A. E. Dobbelaere and D. J. McKeever (Kluwer Academic Publishers), 93–106.
- Tadin, A., Turk, N., Korva, M., Margaletic, J., Beck, R., Vucelja, M., et al. (2012). Multiple co-infections of rodents with hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 388–392. doi: 10.1089/vbz.2011.0632
- Telfer, S., Begon, M., Bennett, M., Bown, K. J., Burthe, S., Lambin, X., et al. (2007). Contrasting dynamics of *Bartonella* spp. in cyclic field vole populations: the impact of vector and host dynamics. *Parasitology* 134, 413–425. doi: 10.1017/S0031182006001624
- Telfer, S., Lambin, X., Birtles, R., Beldomenico, P., Burthe, S., Paterson, S., et al. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330, 243–246. doi: 10.1126/science.1190333
- Tollenaere, C., Bryja, J., Galan, M., Cadet, P., Deter, J., Chaval, Y., et al. (2008). Multiple parasites mediate balancing selection at two MHC class II genes in the fossorial water vole: insights from multivariate analyses and population genetics. *J. Evol. Biol.* 21, 1307–1320. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01563.x
- Trenberth, K. E., and Fasullo, J. T. (2011). Tracking earth's energy: from El Niño to global warming. *Surv. Geophys.* 33, 413–426. doi: 10.1007/s10712-011-9150-2
- Uilenberg, G. (1981). “*Theileria* species of domestic livestock,” in *Advances in the Control of Theileriosis*, eds P. M. Cunningham and A. S. Young, and A. D. Irvin (The Hague; Boston, MA; London: Martinus Nijhoff Publishers), 4–37. doi: 10.1007/978-94-009-8346-5_2

- Vaumourin, E., Gasqui, P., Buffet, J.-P., Chapuis, J.-L., Pisanu, B., Ferquel, E., et al. (2013). A Probabilistic model in cross-sectional studies for identifying interactions between two persistent vector-borne pathogens in reservoir populations. *PLoS ONE* 8:e66167. doi: 10.1371/journal.pone.0066167
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., et al. (2013). Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS ONE* 8:e81439. doi: 10.1371/journal.pone.0081439
- Wansen, K., Pastinen, T., Kuokkanen, S., Wikström, J., Palo, J., Peltonen, L., et al. (1997). Immune system genes in multiple sclerosis: genetic association and linkage analyses on TCR β , IGH, IFN- γ and IL-1ra/IL-1 β loci. *J. Neuroimmunol.* 79, 29–36. doi: 10.1016/S0165-5728(97)00104-5
- Wasserman, S., and Faust, K. (1994). "Social network analysis: methods and applications," in *Introduction to Social Network Analysis*, ed The Press Syndicate of the University of Cambridge (Cambridge; New York, NY: Cambridge University Press), 1–857. doi: 10.1017/CBO9780511815478
- Yee, T. W., and Wild, C. J. (1996). Vector generalized additive models. *J. R. Stat. Soc. B* 58, 481–493.
- Yodzis, P. (1980). The connectance of real ecosystems. *Nature* 284, 544–545. doi: 10.1038/284544a0

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 11 February 2014; paper pending published: 25 March 2014; accepted: 23 April 2014; published online: 15 May 2014.

Citation: Vaumourin E, Vourc'h G, Telfer S, Lambin X, Salih D, Seitzer U, Morand S, Charbonnel N, Vayssier-Taussat M and Gasqui P (2014) To be or not to be associated: power study of four statistical modeling approaches to identify parasite associations in cross-sectional studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:62. doi: 10.3389/fcimb.2014.00062

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

Copyright © 2014 Vaumourin, Vourc'h, Telfer, Lambin, Salih, Seitzer, Morand, Charbonnel, Vayssier-Taussat and Gasqui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Autres Applications
de la Méthode de Screening des
Associations**

En plus de l'étude publiée des jeux de données de Sandra Telfer et Xavier Lambin, concernant les campagnols agrestes infectés par six parasites, et ceux d'Ulrike Seitzer et Diaeldin Salih, concernant les bovins infectés par huit parasites (cf. **Article 2**), nous avons appliqué la méthode de screening des associations de parasites à d'autres jeux de données issus de collaborations. Actuellement, cinq autres jeux de données ont été étudiés, chacun possédant différentes caractéristiques (*e.g.* nombres de parasites détectés, espèces hôtes étudiées, ...).

Le premier jeu de données concerne 443 campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*), échantillonnés dans la forêt de Sénart, en France, dans le cadre des thèses de Maud Marsot et Jean-Philippe Buffet (Buffet *et al.* 2012 : **Annexe 12**, Marsot *et al.* 2013). Ces campagnols sont infectés par deux parasites : *Borrelia afzelii* (11,1%), *Bartonella* spp. (56,9%). D'après le modèle de screening, ces deux bactéries ne sont pas associées (p -value : 0,927).

Le deuxième jeu de données concerne 819 tamias de Sibérie (*Tamias sibiricus*), échantillonnés dans la forêt de Sénart, en France, dans le cadre de la thèse de Maud Marsot (Marsot *et al.* 2013). Ces tamias sont infectés par trois parasites : *B. burgdorferi* sensu stricto (13,2%), *B. afzelii* (14,9%) et *B. garinii* (2,3%). D'après le modèle de screening, ces trois bactéries ne sont pas associées (p -value : 0,180).

Le troisième jeu de données concerne 309 écureuils roux (*Sciurus vulgaris*), échantillonnés en France (Pisanu *et al.* 2014). Ces écureuils sont infectés par quatre parasites : *B. burgdorferi* sensu stricto (16,2%), *B. afzelii* (10,7%), *B. garinii* (3,2%) et *B. valaisiana* (0,3%). D'après le modèle de screening, *B. burgdorferi* sensu stricto et *B. afzelii* sont associées positivement (p -value : 0,0036).

Les deux dernier jeux de données ont été acquis dans le cadre du projet Patho-Id « Pathobiomes des rongeurs et des tiques » financé par le Métaprogramme INRA MEM (Méta-omiques des Ecosystèmes Microbiens) coordonné par Muriel Vayssier-Taussat et Jean-François Cosson. Il s'agit d'un projet dont l'objectif est la détection sans *a priori* d'agents pathogènes et de symbiontes (*i.e.* pathobiomes) présents chez les rongeurs et les tiques.

Le quatrième jeu de données concerne 168 rongeurs d'espèces variées, échantillonnés en Asie. Ces rongeurs sont infectés par sept parasites : *Bartonella* spp. (29,2%), *Anaplasma phagocytophilum* (3%), *Ehrlichia* spp. (10,7%), *Orientia* spp. (1,2%), *Helicobacter* spp. (14,9%), *Borrelia burgdorferi* s.l. (6%) et un parasite inconnu (14,3%). D'après le modèle de screening, ces sept parasites ne sont pas associés.

Le cinquième et dernier jeu de données concerne 264 tiques (*Ixodes ricinus*), échantillonnées dans les Ardennes, en France (Moutailler *et al.* 2014 : **Annexe 7**). Ces tiques

sont infectées par six parasites : *Borrelia miyamotoi* (2,7%), *Borrelia burgdorferi* s.l. (20,5%), *Anaplasma phagocytophilum* (2,7%), *Neoehrlichia mikurensis* (1,5%), *Rickettsia helvetica* (16,7%) et *Bartonella henselae* (16,3%). D'après le modèle de screening, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi* s.l. et *Neoehrlichia mikurensis* sont associées positivement (p -value < 0.001).

Chapitre 3

CARACTERISATION DES INTERACTIONS BIOLOGIQUES ENTRE PARASITES

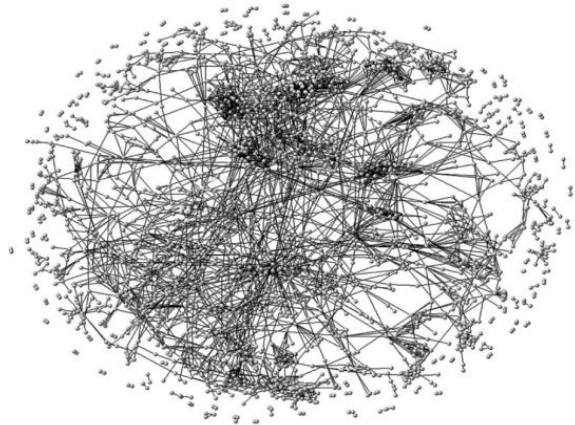


Figure adaptée de Kiemer, L. *et al.* 2007 WI-PHI: a weighted yeast interactome enriched for direct physical interactions. *Proteomics*, 7, 932-943.

D'un point de vue épidémiologique, les interactions entre parasites peuvent altérer les symptômes, la durée d'infection, la probabilité d'infection, la probabilité de transmission et leur virulence (Ezenwa & Jolles 2011, Tompkins *et al.* 2011). Les parasites peuvent interagir en synergie, c'est-à-dire que la présence de l'un favorise l'infection par des parasites ultérieurs. Ils peuvent également interagir de manière antagoniste, la présence de l'un inhibe l'infection par des parasites ultérieurs. Les interactions entre parasites sont souvent considérées comme des interactions deux à deux. Toutefois du fait du multiparasitisme, les interactions au sein d'un ensemble de parasites sont plus probables. Identifier et caractériser les interactions entre parasites est une priorité d'autant plus grande qu'elles concernent des parasites d'importance médicale, vétérinaire ou agronomique majeure.

L'objectif de ce chapitre a été de développer un modèle de coinfection deux à deux entre parasites en fonction d'hypothèses biologiques précises sur ces parasites, *i.e.* hypothèses de transmission, de persistance (**Article 3**). Du fait de leur présence simultanée chez les vecteurs, les parasites vectorisés peuvent être, en théorie, fréquemment transmis en même temps et donc coinfecter le même hôte. Ils sont donc un bon modèle pour étudier les interactions potentielles. Le modèle de détection des interactions a donc été développé pour identifier et caractériser les interactions entre deux parasites vectorisés et persistants chez un hôte. Ce modèle permet de tester si les prévalences des coinfections observées sont significativement différentes de celles attendues sous l'hypothèse d'associations dues au hasard. S'il s'avère que les parasites sont en interaction, il est alors possible de quantifier et d'orienter ces interactions, chez les juvéniles ainsi que chez les adultes. Il permet alors d'accéder à l'historique des infections des individus hôtes malgré l'aspect transversal de l'étude. Le jeu de données étudié, en particulier dans cet article, concernait une population de campagnols roussâtres (*Myodes glareolus*) coinfectés par deux bactéries : *Borrelia afzelii* et *Bartonella* spp.. Aucune interaction n'a été détectée entre ces deux parasites.

Il est possible d'utiliser ce modèle de détection des interactions sur d'autres jeux de données. Toutefois, il est nécessaire d'utiliser des jeux de données de coinfections de deux parasites dans une population d'hôtes, avec les mêmes hypothèses biologiques : détection fiable des parasites, absence de transmission verticale et directe, persistance et caractère asymptomatique de l'infection des parasites chez les hôtes étudiés.

Article 3

Vaumourin E., Gasqui P., Buffet J.P., Chapuis J.L., Pisanu B., Ferquel E., Vayssier-Taussat M. & Vourc'h G. (2013) A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations. *PloS one*, **8**:6, e66167

*Le programme R des fonctions, pour estimer les probabilités du modèle, est disponible en annexe de la thèse (voir **Annexes 10 et 11**).*

A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations

Elise Vaumourin^{1,2*}, Patrick Gasqui¹, Jean-Philippe Buffet², Jean-Louis Chapuis³, Benoît Pisanu³, Elisabeth Ferquel⁴, Muriel Vayssier-Taussat², Gwenaél Vourc'h¹

1 INRA, UR346 Épidémiologie Animale, Saint Genès Champanelle, France, **2** INRA, USC Bartonella et tiques, Maisons-Alfort, France, **3** Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7204 CNRS-P6-CERSP, Paris, France, **4** Institut Pasteur, Equipe des Borrelia, Paris, France

Abstract

Background: In natural populations, individuals are infected more often by several pathogens than by just one. In such a context, pathogens can interact. This interaction could modify the probability of infection by subsequent pathogens. Identifying when pathogen associations correspond to biological interactions is a challenge in cross-sectional studies where the sequence of infection cannot be demonstrated.

Methodology/Principal Findings: Here we modelled the probability of an individual being infected by one and then another pathogen, using a probabilistic model and maximum likelihood statistics. Our model was developed to apply to cross-sectional data, vector-borne and persistent pathogens, and to take into account confounding factors. Our modelling approach was more powerful than the commonly used Chi-square test of independence. Our model was applied to detect potential interaction between *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. that infected a bank vole population at 11% and 57% respectively. No interaction was identified.

Conclusions/Significance: The modelling approach we proposed is powerful and can identify the direction of potential interaction. Such an approach can be adapted to other types of pathogens, such as non-persistents. The model can be used to identify when co-occurrence patterns correspond to pathogen interactions, which will contribute to understanding how organism communities are assembled and structured. In the long term, the model's capacity to better identify pathogen interactions will improve understanding of infectious risk.

Citation: Vaumourin E, Gasqui P, Buffet J-P, Chapuis J-L, Pisanu B, et al. (2013) A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations. PLoS ONE 8(6): e66167. doi:10.1371/journal.pone.0066167

Editor: Ulrike Gertrud Munderloh, University of Minnesota, United States of America

Received: January 30, 2013; **Accepted:** May 3, 2013; **Published:** June 20, 2013

Copyright: © 2013 Vaumourin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This modelling work was supported by the Animal Health department of National Institute of Agronomic Research (<http://www.inra.fr>), Auvergne region (<http://www.auvergnesciences.com>), the Metaprogramme MEM (projet Patho-ID) of INRA and the EU grant FP7-261504 EDENext. It is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext090 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: elise.vaumourin@clermont.inra.fr

Introduction

Many research disciplines in ecology seek to decipher processes behind species co-occurrence (e.g. community ecology [1]; macroecology [2,3]; parasitology [4]). In medicine and epidemiology, a growing number of studies are reporting simultaneous infections by microorganisms which can be pathogenic in many different mammal hosts (wild and domestic animals and humans [5–8]). Pathogen interactions are of crucial medical concern because they can alter host susceptibility, infection length and clinical symptoms. From an epidemiological point of view, interactions may modify infectious risk. For example, in *Drosophila melanogaster*, infection with the bacterial symbiont *Wolbachia* increases resistance to some natural pathogens of *Drosophila*, the RNA virus [9]. How different taxa of microorganisms assemble can indicate their interaction within individual hosts. However, positive or negative co-occurrence of microorganisms that are due to interactions must

be distinguished from those merely due to confounding factors such as environmental, behavioural and physiological host susceptibility (e.g. age, sex, location, season [10,11]). For example, apparent associations in humans between the agent of Malaria and helminth infections may be due to common social or environmental factors rather than a true biological interaction [12].

In host populations, interactions between two microorganisms are suspected when the probability of coinfection is not random once confounding factors have been taken into account. Longitudinal studies, where host individuals are recaptured several times, allow the sequence of infection to be investigated to test whether infection by a given microparasite taxon modifies the infection probability by a subsequent one. For example, Telfer *et al.* [13] used a Generalised Linear Mixed Models (GLMM) to quantify the statistical interactions between the occurrence of 12 pairs of microorganisms in field vole populations. Such an approach is limited to infectious agents which can be detected

without euthanizing the hosts, such as skin or blood microorganisms [11]. In cross-sectional studies, where many microorganisms can be detected, two main approaches are used. First, exploratory statistics investigate whether associations between taxa are statistically significant. The most popular method is the Chi-square test [14] because no *a priori* knowledge on the biological data studied is needed, and it is easy to implement [15]. To discriminate real biologic interactions from statistic associations, an improved Chi-square test has been further developed to take into account confounding factors (see [10]). In this study, Hellard *et al.* have applied their improved Chi-square test to four feline viruses: the Feline Immunodeficiency Virus (FIV), the Feline Herpesvirus (FHV), the Feline Calicivirus (FCV) and the Feline Parvovirus (FPV). However, Chi-square tests are not very powerful and do not give any details on the way an interaction works, *i.e.* the direction of the interaction or its intensity. Other exploratory approaches have been developed to detect statistical associations such as multivariate analyses (PCA, FCA) [16] and the network methods [17], which allow an overview of complex systems and can account for the organization of species interactions with each other. The second main approach used in cross sectional studies is based on the explanatory modelling of processes. The most well-known example of this type of approach is deterministic modelling (*e.g.* SIR or Susceptible, Infected and Recovered models) which allows several processes (demography, transmission, immunity) to be studied and dynamic data to be explored. The main drawback of is that such models require numerous parameters, many of which are poorly known and difficult to obtain. The models consequently are often associated with simulation models [18].

We propose a new modelling approach to identify potential pairwise interactions in cross-sectional studies that combines a probabilistic and a statistical model and allows testing confounding factors. The statistical model with observed data is used to estimate the probabilistic model parameters. Our approach is built on the biological characteristics of microorganisms regarding transmission, persistence and pathogenicity. We developed our model to study two vector-borne pathogens that are considered persistent and non-pathogenic for their reservoir host. We applied the model to detect potential interactions between *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. [19] in bank voles (*Myodes glareolus*). These two bacteria are borne by ticks (*Borrelia afzelii*) and fleas (*Bartonella* spp.), are pathogenic for humans, and are carried asymptotically by rodents [20,21]. They first colonize the dermis of their host, which is the interface between their host and flea and tick vectors [22,23]. The two bacteria then use similar strategies to circumvent host defences, for example, stimulating an increase in the host's production of interleukin to weaken its immune system [24,25]. It is therefore suspected that the bacteria directly interact at the level of the dermis, and indirectly interact with each other through the immune system.

Materials and Methods

Overall Strategy

We used a multi-step approach to model interactions between the two vector-borne pathogens. First, we wrote a probabilistic model based on explicit biological hypotheses regarding the probability of infection by a microorganism, with or without the presence of a second microorganism, in juvenile and adult populations of the reservoir host. Second, we built a statistical model to estimate and test different parameter sets. Third, we compared the sensitivity of our model with a Chi-square test of independence by simulation. Fourth, we applied our model to cross-sectional data obtained in a reservoir population of bank

voles (*Myodes glareolus*) coinfecting by *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp.

Probabilistic Model

The probabilistic model set down the assumptions of a biological model (Figure 1). The assumptions were as follows: microorganisms (1) are detected correctly in hosts, *i.e.* the detection is sensitive (all infected individuals are detected) and specific (all non-infected individuals are found not infected); (2) are not vertically nor directly transmitted among host populations; (3) are persistent in reservoir hosts and (4) do not induce mortality. The life of an individual host was modelled with a juvenile and an adult age class. We assume that the studied population is in a dynamic equilibrium (birth-death).

Infection probabilities of two microorganisms in juvenile and adult populations were considered. The infectious states of individuals were noted as follows: J_i^j , A_i^j , where J =Juvenile stage, A =Adult stage, i for the microorganism number ($i=1$ for microorganism 1, $i=2$ for microorganism 2) and j described the infectious state of the animal ($j=0$ for uninfected, $j=1$ for infected). There were thus four probabilities π to be in an infectious state for each age stage, namely π_m^j and π_a^j in juvenile and adult populations respectively, with m corresponding to the infectious state: π_1 (0,0) not infected, π_2 (1,0) infected by the first microorganism, π_3 (0,1) infected by the second, and π_4 (1,1) infected by both (Tables 1 and 2). We modelled the probability to go from one infectious state to another. The probability of a juvenile to become infected by only one of the parasites was p_i (Figure 2 and Table 3). Since we considered no vertical transmission, the initial infectious state of juveniles was always $J_1^0 J_2^0$. Second, the probability of an adult becoming infected by only one of the parasites was q_i , knowing that it was non-infected

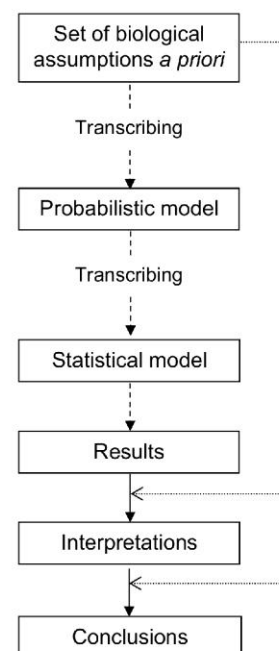


Figure 1. Schema of our approach to modelling interaction.
doi:10.1371/journal.pone.0066167.g001

by the other microorganism during the juvenile state (Figure 3 and Table 4). Different infection probabilities between juveniles and adults were considered because the infection probability may vary due to such phenomena as maturation of the immune system (e.g. [26]). Each probability of being infected was detailed through conditional probabilities, i.e. the explicit equations of the model (Figures 2 and 3, Tables 3 and 4).

To model the interactions between microorganisms, an installation weight \mathbf{W} was introduced that represents how the presence of a microorganism may modify the probability of infection by a subsequent microorganism. During the juvenile state, \mathbf{W}_a was the installation weight of parasite 1 on parasite 2 and \mathbf{W}_b was installation weight of parasite 2 on parasite 1.

If both infection probabilities were independent, $\mathbf{W}_a = 1$ and $\mathbf{W}_b = 1$. If $\mathbf{W}_a > 1$ and $\mathbf{W}_b > 1$, each parasite had a facilitating role in the installation of the other. Conversely if $\mathbf{W}_a < 1$ and $\mathbf{W}_b < 1$, each parasite had an inhibitory role in the installation of the other. Thus, the closest \mathbf{W} was to 1, the weakest the interaction was. Through conditional probabilities, the complete probabilities system of each event for juveniles was obtained (see Table 3). The link that connects \mathbf{W}_a and \mathbf{W}_b was highlighted by the equation (1) for the case of two microorganisms 1 and 2:

$$\mathbf{W}_b = \mathbf{W}_a \cdot (1 - p_2) / [(1 - p_1) + \mathbf{W}_a \cdot (p_1 - p_2)] \quad (1)$$

In the same way, for adults \mathbf{W}_A was the installation weight of parasite 1 on parasite 2, and \mathbf{W}_B the installation weight of parasite 2 on parasite 1. The system of conditional probabilities, as well as the link between \mathbf{W}_A and \mathbf{W}_B , taking into account the infection state of individuals as juveniles, is shown in Table 4.

Altogether, there are eight infection states (four for juveniles and four for adults) in the model. The number of individuals studied, \mathbf{n}^J for juveniles, $\mathbf{n}^J = \sum_{m=1}^{m=4} \mathbf{n}_m^J$, and \mathbf{n}^A for adults, $\mathbf{n}^A = \sum_{m=1}^{m=4} \mathbf{n}_m^A$, were considered as fixed because we worked with observed data.

Translating this idea into a probability, we got $\sum_{m=1}^{m=4} \pi_m^J = 1$ and $\sum_{m=1}^{m=4} \pi_m^A = 1$. Since two parameters were known, six degrees of freedom were available. Therefore, all eight numbers of individuals \mathbf{n}_m^J and \mathbf{n}_m^A or eight probabilities of infections π_m^J and π_m^A could be estimated with six parameters, $\mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2, \mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \mathbf{W}_a$ and \mathbf{W}_A (see Tables 3 and 4).

In our model, the hypothesis of independence of both infections from each other is similar to that of the Chi-square test of independence hypothesis.

Table 1. The four π_m probabilities of infections between two microorganisms for juvenile state.

		J_2^0	J_2^1
		$i=2, j=0$	$i=2, j=1$
J_1^0	$i=1, j=0$	π_1^J	π_2^J
J_1^1	$i=1, j=1$	π_3^J	π_4^J

The parasite studied is referenced by i and j which describe the infectious state of the animal (0 = uninfected, 1 = infected), for more details see text.
doi:10.1371/journal.pone.0066167.t001

Table 2. The four π_m probabilities of infections between two microorganisms for adult state.

		A_2^0	A_2^1
		$i=2, j=0$	$i=2, j=1$
A_1^0	$i=1, j=0$	π_1^A	π_2^A
A_1^1	$i=1, j=1$	π_3^A	π_4^A

The parasite studied is referenced by i and j which describe the infectious state of the animal (0 = uninfected, 1 = infected), for more details see text.
doi:10.1371/journal.pone.0066167.t002

Statistical Model

The probabilistic model was translated into a statistical model so that model parameters ($\mathbf{p}_i, \mathbf{q}_i, \mathbf{W}_a$ and \mathbf{W}_A) could be estimated, and the significance of different parameter sets (i.e. submodel or SM) and risk factors were tested (Figure 1). Different submodels were compared with the general model (GM) through likelihood ratio tests (Table 5). The general model was the model which gathered all parameters together. Risk factors that could favour the infection of both microorganisms were tested by writing submodels that considered risk factors as parameters. The final model was identified as the most parsimonious model *via* the AIC criteria [27] and the parameters of the final model were estimated.

Likelihood of model. The general model was expressed as a multinomial distribution. The probabilities of each of the eight possible infection states depended on a vector of six parameters $\theta = (\mathbf{p}_i, \mathbf{q}_i, \mathbf{W}_a, \mathbf{W}_A)$ which were estimated by maximum likelihood. The parameters were constrained since probabilities of infection had to be between 0 and 1. Thus, \mathbf{p}_i and \mathbf{q}_i were defined in the interval $[0, 1]$ and \mathbf{W}_a applied to a prevalence \mathbf{p}_i was defined in the interval $[0, 1/p_i]$ (it was the same for adults). In order to make the constraint implicit, the following transformations for parameters \mathbf{p}_i and \mathbf{q}_i were performed: $\exp(-\exp(\theta))$ which was included in $[0, 1]$ and $\theta \in (-\infty, +\infty)$. Similarly for \mathbf{W}_a and \mathbf{W}_A , using $\exp(\theta)$ which was a positive value, when θ is in $(-\infty, +\infty)$. In this way, the parameter vector θ was estimated.

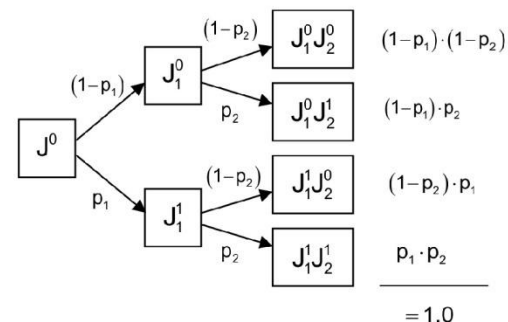


Figure 2. Model of the probability of microorganism infection of juvenile under independence hypothesis. J_1^0 indicates state of non-infection with microorganism 1 and J_1^1 infected state with microorganism 1. It is the same for the microorganism 2. The probability of being infected with microorganism 1 (respectively 2) was defined with p_1 (respectively p_2). We assume the independence assumption of two microorganisms, the absence of vertical and direct transmission absence (J_0 is initial state: free of any infection), the persistence of infection and the asymptomatic character of pathogens for reservoir host.
doi:10.1371/journal.pone.0066167.g002

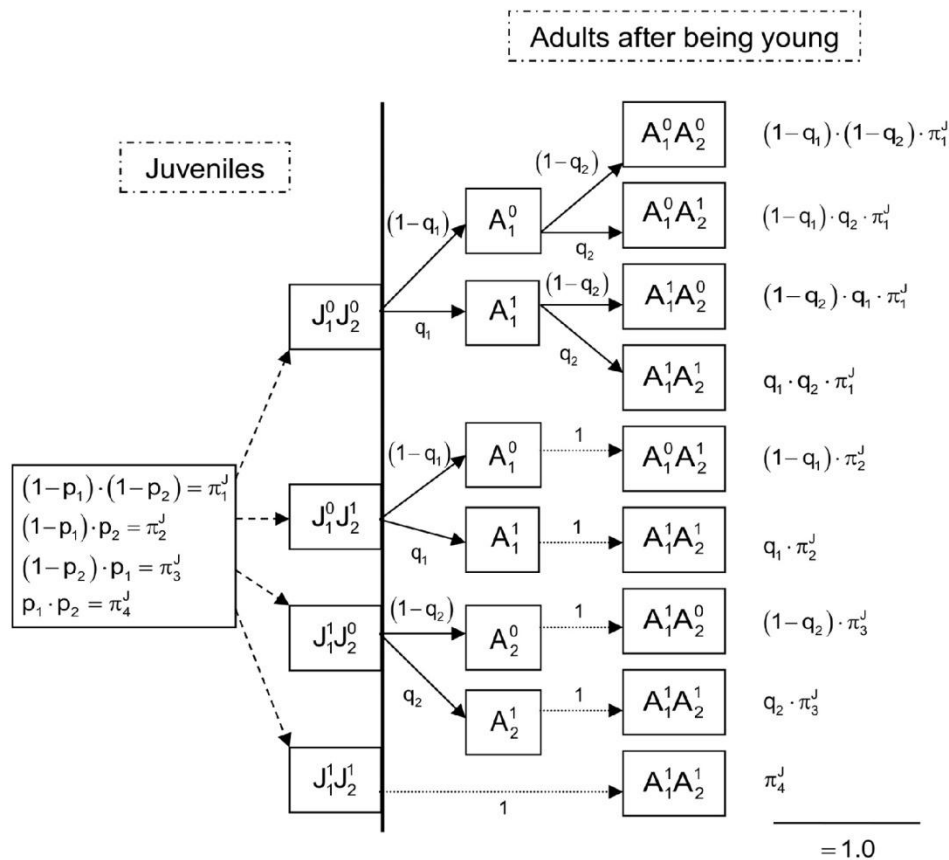


Figure 3. Model of the probability of microorganism infection of adult under independence hypothesis. A_1^0 indicates state of non-infection with microorganism 1 and A_1^1 state infected with microorganism 1. It is the same for the microorganism 2. The probability of being infected with microorganism 1 (respectively 2) was defined with q_1 (respectively q_2). We assume the independence assumption of two microorganisms, from the final state of the Juvenile model, the absence of vertical and direct transmission, the persistence of infection and the asymptomatic character of pathogens for reservoir host.

doi:10.1371/journal.pone.0066167.g003

Testing submodels. The general model with the six parameters was a saturated model. In saturated models, estimated data are expected to match exactly to observed data. If they do not, then either some of the hypotheses are not relevant or an important factor influencing infection probability has been omitted. When this is the case, either a new model has to be constructed with additional parameters that translate the new hypotheses, or the missing factors have to be considered.

Since the different submodels were nested (see Table 5), likelihood ratio tests were used to test the significance of different submodels. The likelihoods of submodels were named L_{SM} and were compared to the general model whose likelihood was L_{GM} [28]. The test statistic was D_{obs} .

$$D_{obs} = +2[\log L_{GM}(\theta_{GM}) - \log L_{SM}(\theta_{SM})]$$

Table 3. Probabilities of each microorganism infection event under non-independence in juveniles.

J_1^0	J_1^1
J_1^0	J_1^1
J_1^0	J_1^1
J_1^0	J_1^1

With $p_1 = P(J_1^1 | J_1^0)$, $W_b \cdot p_1 = P(J_1^1 | J_1^1)$, $p_2 = P(J_2^1 | J_1^0)$, $W_a \cdot p_2 = P(J_2^1 | J_1^1)$ and $K^J = 1 - p_1 \cdot p_2 \cdot (W_a - 1) \cdot (W_b - 1)$, for more details see text and Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0066167.t003

Table 4. Probabilities of each microorganism infection event under non-independence in adults.

A_1^0	A_2^1
A_1^0	A_2^1
A_1^1	A_2^2

With $q_1 = P(A_1^0 | [A_1^0 \cap (J_1^0 \cap J_2^0)])$, $W_B \cdot q_1 = P(A_1^1 | [A_1^1 \cap (J_1^0 \cap J_2^0)])$, $q_2 = P(A_2^1 | [A_2^1 \cap (J_1^0 \cap J_2^0)])$, $W_A \cdot q_2 = P(A_2^2 | [A_2^2 \cap (J_1^0 \cap J_2^0)])$ and $K^A = 1 - q_1 \cdot q_2 \cdot (W_A - 1) \cdot (W_B - 1)$, for more details see text and Table 2.
doi:10.1371/journal.pone.0066167.t004

Under H_0 (i.e. null hypothesis), the submodel should not be significantly different from the general model. Thus, the D_{obs} random variable followed a law of χ^2 , with $(\theta_{GM} - \theta_{SM})$ degrees of freedom, where θ_{GM} contained the parameter number of the general model and θ_{SM} the parameter number of the submodel.

In the general model, none of the parameters were fixed, unlike those in the submodels. In fact, submodels 1, 2, 3 and 4 (Table 5) allowed us to test, by fixing the weights W of adults or juveniles to 1, whether the weights of infection were significantly different from one, i.e. whether associations of microorganisms were random. The possibility that the weight of infection varied according to the state (juvenile or adult) also could be tested. For example, in submodel 4 (see Table 5), microorganisms were randomly associated, and all interaction weights were equal to one. Microorganisms were randomly associated during the juvenile stage ($W_A = 1$) in submodel 1 and during the adult stage in submodel 2 ($W_A = 1$). The weight of interaction was the same at the juvenile and adult stages in submodel 3. If a different biological model was used, other submodels could have been tested.

Estimating the final model confidence interval and parameters. Once the appropriated submodel, i.e. the final model, had been selected, the parameters of this model, i.e. probabilities and estimated weight of interactions W_A and W_B could be estimated. To do so, the inverse transformation on estimated parameters was performed. Thus $\hat{p} = \exp(-\exp(\hat{\theta}))$ and $\hat{W} = \exp(\hat{\theta})$.

With Hessian matrix inverse, the matrix of variance/covariance $\Sigma(\hat{\theta})$ was estimated. Given that estimates of maximum likelihood $(\hat{\theta})$ were Gaussian, the final confidence interval (CI) was calculated

from the estimates and standard errors of the parameters $CI_{0.95} = [\hat{\theta} - 1.96 \cdot \hat{\sigma}(\hat{\theta}); \hat{\theta} + 1.96 \cdot \hat{\sigma}(\hat{\theta})]$ or $CI_{0.95} = [\hat{\theta}_{min}; \hat{\theta}_{max}]$.

The parameter estimates and the 95% confidence intervals thus associated: $CI_{0.95} = [\hat{\theta}_{min}; \hat{\theta}_{max}]$ or $CI_{0.95} = [\exp(-\exp(\hat{\theta}_{max})); \exp(-\exp(\hat{\theta}_{min}))]$ and $CI_{0.95} = [\hat{W}_{min}; \hat{W}_{max}]$ or $CI_{0.95} = [\exp(\hat{\theta}_{min}); \exp(\hat{\theta}_{max})]$ were estimated in the original scale.

Then π_m probabilities (via Tables 1, 2, 3 and 4) and expected values for the eight observed infection possibilities (four for juveniles and four for adults) were estimated.

Estimating risk factors common to microorganisms. Factors that may influence the risk and the weight of the infection were tested in the final model. The number of risk factors that can be tested depends on the degrees of freedom available. The effect γ of factors F_p , which can impact the probabilities of infection, was integrated as follows:

$\hat{p} = \exp(-\exp(\hat{\theta}_p + \hat{\gamma}_{F_p}))$, with $\sum_{i=1}^2 \hat{\gamma}_{F_p} = 0$. Similarly, the effect γ

of factors F_W , which can impact the weight of interactions, was integrated as follows: $\hat{W} = \exp(\hat{\theta}_W + \hat{\gamma}_{F_W})$, with $\sum_{i=1}^2 \hat{\gamma}_{F_W} = 0$.

All of the programs used in the analysis were written using R software (version 2.12.1) accessible on the site <http://cran.r-project.org/>. We used in particular the *nlm()* minimization function. We are in the process of developing a correctly assembled package of programming codes to facilitate its future use. All the functions that we used are available in a non-definitive form in the supplementary information (Functions S1).

Table 5. The different submodels compared to the general model.

Model Name	Parameter vector (number)
General Model	θ_{GM} : $p_1, p_2, q_1, q_2, W_A, W_B$ (6 parameters)
Submodel 1 « $W_A = 1$ »	θ_{SM1} : p_1, p_2, q_1, q_2, W_B (5 parameters)
Submodel 2 « $W_B = 1$ »	θ_{SM2} : p_1, p_2, q_1, q_2, W_A (5 parameters)
Submodel 3 « $W_A = W_B$ »	θ_{SM3} : p_1, p_2, q_1, q_2, W (5 parameters)
Submodel 4 « $W_A = W_B = 1$ »	θ_{SM4} : p_1, p_2, q_1, q_2 (4 parameters)

The probability of being infected by a microorganism for juveniles is noted p and q for adult hosts. W_A is installation weight of parasite during an infection to juvenile state and W_B during an infection to adult state (for more details see text).

doi:10.1371/journal.pone.0066167.t005

Simulation Study of Our Model versus Chi-square Test of Independence

Our model was compared to the Chi-square test of independence by simulating the sensitivity (α) and power ($1 - \beta$) of both. The α risk (or the error of second type) was the risk to conclude that the interaction (alternative hypothesis H_1) was significant when in fact the association was random (null hypothesis H_0). The β risk was the risk to conclude that the association was random (H_0) when there was interaction (H_1). The objectives were to verify that the α risk was well controlled *a priori* and to evaluate the influence of sample size on $(1 - \beta)$ the power of tests. The statistic Chi-square test of independence for two microorganisms infecting juvenile and adult hosts, under the hypothesis H_0 , was considered. The estimated number n_m^J or n_m^A of each m modality of each state must be greater than five to perform this test. The distribution of the sensitivity (α) and the power ($1 - \beta$) was simulated for both

models according to the parameters and sample size. The dataset of θ parameters and total sample size n^J and n^A fixed *a priori*, were considered with the probabilities of juveniles and adults to become infected $(p_i, q_i) \in \{0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90\}$, W_a and W_A varied from 0.5 to 1.5 and the sample size varied from 200 to 1000.

Biological model: application to infection of a bank vole population by *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp

Ethical statement. All conducted experiments complied with the current laws of France. Trapping and collection of rodents conducted on the study site (Forêt de Sénart, Essonne, France, 48°39'N, 2°29'E) were carried out under the control of Laurent TILLON (Office National des Forêts), Head of Research Group mammals. The project was approved by the Ethics Committee in Animal Experiment (CEMEA Auvergne). Steps were taken to ameliorate suffering in accordance with the recommendations [29]. Rodents were euthanized by cervical dislocation. Ear punch biopsies were limited to the minimum size needed, the puncture was disinfected with hydrogen peroxide and checked before releasing the animal.

Biological model. A total of 443 bank voles were tested, 252 being infected by *B. afzelii* and 49 being infected by *Bartonella* spp. PCRs were used to detect *B. afzelii* DNA on ear biopsies and *Bartonella* spp. DNA on liver and spleen samples [19,30]. Both pathogens are considered asymptomatic in their rodent hosts [31]. They are not transmitted vertically or directly, so individual infections are considered to be independent [32,33]. The age of the rodents was estimated according to their body mass. The individuals weighing less than 18 g were considered as juveniles (18 g being the smallest observed weight for a female in early gestation, J.-L. Chapuis, pers. comm.).

For *Borrelia afzelii*, we took samples from the ear, which, with its thin and highly vascularised epidermis, is highly appreciated by ticks and thus a prime site of *Borrelia afzelii* infection [34]. For *Bartonella* spp., we used a homogenate of liver and spleen. As the infecting *Bartonella* spp. are intracythrotic, not haemolytic, and these organs are “cemeteries of red blood cells”, this method confirmed our hypothesis of absence of false negatives [35]. The PCRs carried out are considered to be a specific detection method for both *B. afzelii* and *Bartonella* spp. [36,37].

Both pathogens can also be considered persistent. Indeed, for *B. afzelii*, important mechanisms of immune escape in this bacteria (e.g. proteins provide protection from innate and adaptive host immune responses) seem to confirm the hypothesis of an on-going infection in rodents [24,38,39]. For *Bartonella* spp., infection is persistent in appearance. This intracellular bacterium is found mainly in red blood cells which have an average life of 30 days in rodents [40]. The bacterium is eliminated with the natural death of the cell. However, reinfection from infected vectors occurs constantly [41]. In addition, no resistance development (acquired immunity) has been shown *in vivo* [42]. The duration of the infection status is on average two months but infections overlap [43].

Borrelia afzelii was identified as microorganism 1 and *Bartonella* spp. as microorganism 2. Table 5 presents the first four submodels tested. Based on results and data, we then built and tested a fifth submodel in which « $W_a = W_A = 1$ and $q_2 = 0$ ». Only 3 parameters had to be estimated for submodel 5: θ_{SM5} : p_1, p_2, q_1 . This submodel was tested because, in the data, the proportion of infected juvenile by *Bartonella* spp. seemed to be similar to that of infected adults. The influence of two risk factors on the model parameters (p_i, q_i) was tested: the presence of ticks on each rodent and the sex of the animal. These were chosen because both

pathogens can be transmitted by ticks even though ticks are not the main vector for *Bartonella* spp. [44]. The sex of bank voles furthermore induces differences in their physiology and behaviour which have been shown to influence infectious risk probability [45].

Results

Simulation Results

For both modelling approaches (the probabilistic model and the Chi-square test of independence), the α risk, under H_0 , even with a strong sample size gradient (N), varied little around the value of 0.05 (see respectively Table S1 and Table S2). In contrast, the power of the test $(1 - \beta)$, under H_1 , increased with the sample size. The more the infection weight (W_a or W_A) departed from 1, the lower the sample size could be for the power of the test to be maximal, i.e. $(1 - \beta)$ near 1 (Table S3 and Table S4). The reliability of detection of weak interactions depended on the sample size. In all cases, the probabilistic model was more powerful than the Chi-square test of independence, particularly to detect inhibition.

Parameters of the Model for *Bartonella* spp. and *Borrelia afzelii* Coinfection in the Bank Voles

The general model, with the six parameters: $p_1, p_2, q_1, q_2, W_a, W_A$, described perfectly observed data (i.e. the numbers of individuals in each infectious state are identical between estimated data and observed data). None of the submodels were significantly different from the general model (submodel 1, P -value = 0.064; submodel 2, P -value = 0.403; submodel 3, P -value = 0.076; submodel 4, P -value = 0.179; submodel 5 P -value = 0.328). However, with the AIC criteria of the submodels were the following: submodel 1, AIC = 904.305; submodel 2, AIC = 901.568; submodel 3, AIC = 904.026; submodel 4, AIC = 902.314; submodel 5 AIC = 900.314. Thus, submodel 5 (with $W_a = W_A = 1$ and $q_2 = 0$) was the model that best fit the observed data (i.e. the smaller AIC criteria) and had the fewest parameters to estimate. As submodel 5 was the most parsimonious model, it was chosen as the final model.

In the final model, the values of different parameters describing the infection probabilities for *Borrelia afzelii* were p_1 : 0.017 [0.003; 0.055] and q_1 : 0.130 [0.090; 0.179], and for *Bartonella* spp. p_2 : 0.569 [0.521; 0.614] and q_2 : 0.000. Interaction weights between these two microorganisms were equal to 1 ($W_a = W_A = W_b = W_B = 1$). Thus the probabilities of infection by both microorganisms were independent. These parameters allowed us to estimate the number of juveniles and adults for different infection states (see Table S5).

The probabilities of being in one of the infectious state were not significantly influenced by sex (P -value = 0.338) or tick carriage (P -value = 0.105).

The Chi-square test of independence, with $\chi^2 = 2.71$ (P -value = 0.099) for juveniles and $\chi^2 = 0.01$ (P -value = 0.920) for adults, also indicated that both of the microorganisms' distributions were independent.

Discussion

Identifying when pathogen associations correspond to biological interactions is one of the challenges of multi-pathogen studies in populations. We propose a probabilistic modelling approach to identify potential pathogen interaction in cross-sectional studies. Our approach is based on explicit biological hypotheses (micro-organism transmission and persistence characteristics) and is more

powerful than the commonly used Chi-square test. The model we propose has the advantage of describing the observed data perfectly (*i.e.* the numbers of individuals in each infectious state are identical between estimated data and observed data) by using a probabilistic model with defined limits. We model the life of the host individual by differentiating the juvenile state from the adult state. Our model quantifies and characterises the direction of potential interactions, providing that relevant confounding factors are taken into account. This type of model can be used to describe the distributions of different species of pathogens in a reservoir host.

Development of Our Approach and Comparison with Chi-square Test

Our modelling approach has been used little in epidemiology to date (Figure 1) [46]. The approach is based on the transcription of explicit biological hypotheses into a probabilistic model which is, in turn, transcribed into a statistical model. This approach has been used in plant [47] and medical research; for example, Bergemann *et al.* [48] applied it to assess neurocognition in various contexts. The main advantage of basing a study on *a priori* knowledge drawn from a biological model is that more precise conclusions can be obtained, and therefore mechanisms (*e.g.* interaction) can be characterized better. In contrast, basic statistical models such as Chi-square have fewer assumptions and thus the amount of information given by the models is reduced. With our method, if observed data did not correspond to the estimated data, it meant that a biological hypothesis posed *a priori* was not valid. Our approach thus involves a back and forth process between hypotheses and models. When the observed data correspond to the estimated data, the hypotheses cannot be rejected.

The model has several other advantages compared to a conventional Chi-square test. First, it is more powerful and the alpha risk (or the error of second type) is well controlled whatever the sample size (see Tables S2, S3, S4, S5). Second, the sample size in each category of individuals can be smaller than five, which is not the case for the Chi-square test. Third, our modelling strategy is based on transmission modelling between two life stages, juvenile and adult. That allows us to estimate the effect the infection of the first microorganism has on the infection of the second, and to quantify and describe the direction of potential interactions. Furthermore, this mimics what can be done with longitudinal studies using population data such as that conducted by Telfer *et al.* [13], in which generalized linear mixed models (GLMM) were employed. Finally, risk factors can be included easily in the different parameters of the models to discriminate true interactions from purely statistical interactions [10,13]. However, the number of risk factors is limited since this number depends on the available number of degrees of freedom. In the example we provided, we could only study four categories of risk (male/female, infested by ticks/not infested) to avoid the over-parameterization of the model.

Our model has several limitations nonetheless. Our modelling approach requires an important amount of data for the detection of weak interactions, which is sometimes difficult to obtain (see Table S3). Indeed, the power of detection of interaction increases with the sample size, as is the case for other methods such as the Chi-square test. Furthermore, the sensitivity study of our model showed a better detection of facilitation than inhibition. This is because the infection weight (W_a or W_A), is bounded between $(1, 1/p_i]$ during facilitation, while its range is smaller $(0, 1)$ during inhibition.

Application to *B. afzelii* and *Bartonella* spp. Data in a Bank Vole Population

Applying the model to *B. afzelii* and *Bartonella* spp. infection probabilities in bank voles, the presence of the first or the second bacterium did not influence the probability of infection of the other bacterium. Thus, no interaction was found, either directly or indirectly *via* the immune system. At their point of entry, the bacteria may have a limited opportunity to interact directly because they are inoculated at different locations on the host. Ticks, which transmit *B. afzelii*, are found most frequently on parts of the cephalic region where the skin is thin and unattainable by grooming (*i.e.* eyes, muzzle, ears), whereas fleas, which transmit *Bartonella* spp., have no preferred biting sites [49,50]. However, despite different entry points, interaction through a serological cross-reactivity has already been found for *Borrelia burgdorferi* interacting with *Treponema pallidum* [51].

The probability for adults to be infected by *B. afzelii* (13%) was higher than the probability for juveniles (2%), a result commonly found in rodents [39,52]. Surprisingly, the probability for rodents to be infected by *Bartonella* spp. at the adult stage was null. According to the sets of biological hypotheses in our model, this result means that most individuals were infected at the juvenile stage and not at the adult stage. Part of the population thus could be resistant to flea infestation, as was observed by Hawlena *et al.* [53] in other rodent and flea species. Another possible reason is that part of the population is resistant to *Bartonella* spp. infection, similar to what Greene *et al.* [54] observed in cats, where the cats became resistant to reinfection by *B. henselae*. However, the biologically surprising results obtained for adults force us to reconsider the hypothesis of persistence, which was based on the successive colonisation of hosts by different *Bartonella* species [55]. Another model without an assumption of persistence therefore should be developed.

None of the risk factors (tick carriage and sex) tested were significant. The absence of effect of sex on infection probability has been found in other studies. For instance, Bajer *et al.* [45] found that sex played a minor role for several haemoparasites, including *Bartonella grahamii*. The fact that we did not find any effect of tick carriage is rather surprising for *B. afzelii* [56]. The reason might be that the test lacked power because only presence/absence of ticks could be tested, not the quantified tick burden. Testing the impact of flea burden on infection probability of *Bartonella* spp. would have been interesting [33]. Unfortunately, the fleas were not harvested in our bank vole population.

Perspectives: Developing other Probabilistic Models for other Sets of Biological Hypotheses

Our probabilistic model was specific to a certain sets of biological hypotheses, in particular to microparasites that were persistent, vector-borne and not pathogenic to the reservoir host. Two main hypotheses could be investigated to broaden the study of pathogen interactions to non-reservoir hosts and non-persistent microorganisms. The general approach would remain the same, but new parameters would be added, which would decrease the degrees of freedom. For instance, in the case of non-persistence, the model would have to take time into account. The probabilities of transition from one state to another would have to be estimated based on observed data.

Our paper proposes a novel approach to model the dependence of co-occurrence between two pathogens and to characterise this dependence. This methodology provides an opportunity to study interactions using data of cross-sectional studies, and this, despite the limited information available in the dataset (*e.g.* no information

on infection span, no individual history). Our methodology is a population-centric modelling approach (e.g. average values) and not individual-centered. Therefore, our model allowed to quantify and characterise the potential interactions, providing that relevant confounding factors are taken into account. It provides avenues and opportunities to deepen thinking on the interaction modelling. This method responds to current needs by taking into account multi-pathogen relationships, which will allow the development of better controls and preventive health care. By identifying pairs of potentially interacting species [57–60], it furthermore will clarify fundamental processes of organism assemblages.

Supporting Information

Table S1 Variation of the α risk under H0 of test based on our probabilistic model, according to different number of individuals and different pathogen prevalences. 1000 simulations were performed to create a simulated data set. The numbers of individuals of different states of infection were drawn at random from a multinomial distribution. The model parameters were fixed *a priori*: $(p_i, q_i) \in \{0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90\}$ under the null hypothesis ($W_a = W_A = 1$), for a range from 200 to 1000 individuals. The estimated α risk can thus be compared to the theoretical value defined *a priori* (0.05). (XLS)

Table S2 Variation of the α risk under H0 of Chi-square test of independence for juveniles and for adults, according to different number of individuals and different pathogen prevalences. 1000 simulations were performed to create a simulated data set. The numbers of individuals of different states of infection were drawn at random from a multinomial distribution. The model parameters were fixed *a priori*: $(p_i, q_i) \in \{0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90\}$ under the null hypothesis ($W_a = W_A = 1$), for a range from 200 to 1000 individuals. The estimated α risk can thus be compared to the theoretical value defined *a priori* (0.05). (XLS)

Table S3 Evaluation of the power of the test ($1 - \beta$) under H1 for different weights of infection for test based on our probabilistic model. 1000 simulations were performed to create a simulated

data set. The numbers of individuals of different states of infection were drawn at random from a multinomial distribution. The model parameters were fixed *a priori*: $(p_i, q_i) \in \{0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90\}$ under different alternative hypotheses with $W_a \in [0.5, 1.5]$ and $W_A \in [0.5, 1.5]$, for a range from 200 to 1000 individuals. (XLS)

Table S4 Evaluation of the power of the test ($1 - \beta$) under H1 for different weights of infection for Chi-square test of independence for juveniles and for adults. 1000 simulations were performed to create a simulated data set. The numbers of individuals of different states of infection were drawn at random from a multinomial distribution. The model parameters were fixed *a priori*: $(p_i, q_i) \in \{0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90\}$ under different alternative hypotheses with $W_a \in [0.5, 1.5]$ and $W_A \in [0.5, 1.5]$, for a range from 200 to 1000 individuals. (XLS)

Table S5 Comparison of observed and estimated of different states of infection for the final model. The total sample size was 119 for juveniles (A) and 324 for adults (B). (XLS)

Functions S1 Functions to estimate the model probabilities. (TXT)

Acknowledgments

We are grateful to the « Tiques et Maladies à Tiques » working group of the « Réseau Ecologie des Interactions Durables » for discussion and support. We thank Sébastien Masségla, Elie Marcheteau, Valérie Poux, Natacha Sertour and Martine Garnier for their help with the molecular biology analyses, Nelly Dorr for the database and Grace Delobel for English proofreading.

Author Contributions

Analyzed the data: EV. Contributed reagents/materials/analysis tools: PG. Wrote the paper: EV PG GV MVT. Supervised the work: GV MVT. Designed and perform the field work: BP JLC. Designed the Bartonella PCR method: JPB. Identification Borrelia species: EF.

References

- Gotelli NJ, McCabe DJ (2002) Species co-occurrence: a meta-analysis of J.M. Diamond's assembly rules model. *Ecology* 83: 2091–2096.
- Horner-Devine MC, Silver JM, Leibold MA, Bohannan BJM, Colwell RK, et al. (2007) A comparison of taxon co-occurrence patterns for macro- and microorganisms. *Ecology* 88: 1345–1353.
- Fuhrman JA (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459: 193–199.
- Tello JS, Stevens RD, Dick CW (2008) Patterns of species co-occurrence and density compensation: a test for interspecific competition in bat ectoparasite infracommunities. *Oikos* 117: 693–702.
- Cox FEG (2001) Concomitant infections. *Parasitology* 122: S23–S38.
- Tadin A, Turk N, Korva M, Margalef J, Beck R, et al. (2012) Multiple co-infections of rodents with hantaviruses, *Leptospira*, and *Babesia* in Croatia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12: 388–392.
- Saisongkroh W, Rolain JM, Suputtamongkol Y, Raoult D (2009) Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *Journal of the Medical Association of Thailand* 92: 707–731.
- Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, et al. (2009) *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One* 4: e8540.
- Teixeira I, Ferreira A, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 6: e1000002.
- Hellard E, Pontier D, Sauvage F, Poulet H, Fouchet D (2012) True versus false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses. *PLoS One* 7: e29618.
- Telfer S, Birdes R, Bennett M, Lambin X, Paterson S, et al. (2008) Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology* 135: 767–781.
- Mwangi TW, Bethony J (2006) *Malaria* and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Annals of Tropical Medicine* 100: 551–570.
- Telfer S, Lambin X, Birdes R, Beldomenico P, Burthe S, et al. (2010) Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243–246.
- Slots J, Kamma JJ, Sugar C (2003) The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *Journal of Periodontal Research* 38: 318–323.
- Tsai YL, Chuang ST, Chang CC, Kass PH, Chomel BB (2010) *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 917–923.
- Tollenaere C, Bryja J, Galan M, Cadet P, Deter J, et al. (2008) Multiple parasites mediate balancing selection at two MHC class II genes in the fossorial water vole: insights from multivariate analyses and population genetics. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1307–1320.
- Fenner AL, Godfrey SS, Bull MC (2011) Using social networks to deduce whether residents or dispersers spread parasites in a lizard population. *The Journal of Animal Ecology* 80: 835–843.
- Rohani P, Green CJ, Mantilla-Beniers NB, Grenfell BT (2003) Ecological interference between fatal diseases. *Nature* 422: 885–888.
- Buffet JP, Marsot M, Vaumourin E, Gasqui P, Masségla S, et al. (2012) Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35: 583–589.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SGT, Hoodless AN, Nuttall PA, et al. (1998) Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1169–1174.
- Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection* 17: 487–493.

22. Pulliainen AT, Dehio C (2012) Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 563–599.
23. Hovius JWR, van Dam AP, Fikrig E (2007) Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology* 23: 434–438.
24. Fikrig E, Narasimhan S (2006) *Borrelia burgdorferi*-traveling incognito? *Microbes and Infection* 8: 1390–1399.
25. Merrell DS, Falkow S (2004) Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 430: 250–256.
26. Holt PG, Jones CA (2000) The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 55: 688–697.
27. Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
28. Vuong QH (1989) Likelihood ratio tests for model selection and non-nested hypotheses. *Econometrica* 57: 307–333.
29. Sikes RS, Gannon WL, the Animal C, Use Committee of the American Society of M (2011) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92: 235–253.
30. Marsot M, Sigaud M, Chapuis JL, Ferquel E, Cornet M, et al. (2011) Introduced siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barbeni*) harbor more-diverse *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies than native bank voles (*Myodes glareolus*). *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5716–5721.
31. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, et al. (2009) Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research* 40: 1–22.
32. Anguita J, Hedrick MN, Fikrig E (2003) Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 493–504.
33. Bown KJ, Bennett M, Begon M (2004) Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerging Infectious Diseases* 10: 6–9.
34. Sinsky RJ, Piesman J (1989) Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1723–1727.
35. Boulouis HJ, Chang C, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB (2005) Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research* 36: 383–410.
36. Maurer JJ (2011) Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 259–279.
37. Postic D, Assous MV, Grimont PA, Baranton G (1994) Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 743–752.
38. Diterich I, Rauter C, Kirschning CJ, Hartung T (2003) *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infection and Immunity* 71: 3979–3987.
39. Humair PF, Rais O, Gern L (1999) Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118: 33–42.
40. Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, et al. (2008) The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective. *Journal of Animal Ecology* 77: 984–997.
41. Kosoy M, Mandel E, Green D, Marston E, Jones D, et al. (2004) Prospective studies of *Bartonella* of rodents. Part II. Diverse infections in a single rodent community. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 4: 296–305.
42. Bai Y, Calisher CH, Kosoy MY, Root JJ, Doty JB (2011) Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *anselmii*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1728–1731.
43. Kosoy MY, Regnery RL, Kosaya OI, Childs JE (1999) Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* species. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 275–284.
44. Halos L, Jamal T, Maillard R, Beugnot F, Le Menach A, et al. (2005) Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. *Veterinary Research* 36: 79–87.
45. Bajer A, Pawelczyk A, Behnke JM, Gilbert FS, Sinski E (2001) Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 122: 43–54.
46. Fabre F, Chadœuf J, Costa C, Lecoq H, Desbiez C (2010) Asymmetrical over-infection as a process of plant virus emergence. *Journal of Theoretical Biology* 265: 377–388.
47. Soubeyrand S, Thébaud G, Chadœuf J (2007) Accounting for biological variability and sampling scale: a multi-scale approach to building epidemic models. *Journal of the Royal Society, Interface* 4: 985–997.
48. Bergemann TL, Bangirana P, Boivin MJ, Connett JE, Giordani BJ, et al. (2012) Statistical approaches to assess the effects of disease on neurocognitive function over time. *Journal of Biometrics and Biostatistics* S7: 1–8.
49. Krasnov BR (2008) Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology. New York: Cambridge University Press. 593–593 p.
50. Sonenshine DE (1993) Biology of ticks. Oxford: Oxford University Press. 465–465 p.
51. Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, et al. (1993) Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. *Research in Microbiology* 144: 251–257.
52. Sinski E, Pawelczyk A, Bajer A, Behnke JM (2006) Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13: 295–300.
53. Hawlena H, Abramsky Z, Krasnov BR (2005) Age-biased parasitism and density-dependent distribution of fleas (*Siphonaptera*) on a desert rodent. *Oecologia* 146: 200–208.
54. Greene CE, McDermott M, Jameson PH, Atkins CL, Marks AM (1996) *Bartonella henselae* infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1682–1685.
55. Paziewska A, Harris PD, Zwolińska L, Bajer A, Siński E (2012) Differences in the ecology of *Bartonella* infections of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in a boreal forest. *Parasitology* 139: 881–893.
56. Vourc'h G, Marnet J, Chassagne M, Bord S, Chapuis JL (2007) *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) introduced in suburban forests in France. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7: 637–641.
57. Gotelli NJ, Ulrich W (2010) The empirical Bayes approach as a tool to identify non-random species associations. *Oecologia* 162: 463–477.
58. Gotelli NJ, Ulrich W (2012) Statistical challenges in null model analysis. *Oikos* 121: 171–180.
59. Ulrich W, Gotelli NJ (2007) Disentangling community patterns of nestedness and species co-occurrence. *Oikos* 116: 2053–2061.
60. Ulrich W, Gotelli NJ (2010) Null model analysis of species associations using abundance data. *Ecology* 91: 3384–3397.

Discussion générale et Perspectives

Le multiparasitisme, et surtout les associations et les interactions potentielles qui en découlent, jouent un rôle primordial dans la structuration des populations d'hôtes et de parasites. Notre objectif était de développer des méthodes de détection des associations et des interactions multiparasitaires. Notre étude a abouti à deux résultats majeurs : 1) La création d'une méthode de screening des associations de parasites et l'adaptation, à l'échelle multiparasitaire, de méthodes plus standard pour détecter les associations entre parasites, sans avoir besoin de connaissances *a priori* sur les modèles biologiques étudiés (*i.e.* hôtes et parasites) et 2) le développement d'un modèle probabiliste particulier (*i.e.* spécifique à des hypothèses biologiques données) illustrant l'étude des interactions et permettant la caractérisation de leur orientation et de leur intensité *via* des données issues d'études transversales.

Nous allons dans un premier temps aborder les différentes barrières à lever pour poursuivre les études sur le multiparasitisme. Suite à mon travail de thèse, nous en avons identifié trois : 1) L'analyse simultanée de plus de 10 parasites, 2) la prise en compte des facteurs de risque communs et 3) l'étude des cas de non-indépendance entre les individus hôtes (*e.g.* la contagion). Nous avons également mis en avant deux barrières secondaires au vu du contexte dans lequel ce travail s'inscrit (*i.e.* les études transversales) : 1) La prise en compte de l'aspect dynamique des infections et 2) la variabilité de la sensibilité et de la spécificité des méthodes de détection des parasites. Enfin, nous détaillerons les possibles utilisations concrètes de nos connaissances sur le multiparasitisme pour gérer au mieux les parasites.

1. Stratégies pour analyser simultanément plus de 10 parasites

Nous avons développé un modèle – la méthode de screening – qui semble optimal jusqu'à 10 parasites (cf. **Chapitre 2**). Cette méthode, ainsi que les autres approches adaptées (GLM multinomial, chi-deux généralisé et réseaux), sont basées sur un raisonnement dit « en combinaisons » de parasites pour pouvoir les comparer dans des conditions égales. Nous ne les avons pas étudiées dans les conditions optimales propres à chaque méthode. Nous les avons contraintes à l'uniformité, malgré leurs spécificités bien particulières amenant à divers avantages et inconvénients. Avec un raisonnement en combinaisons, le nombre de parasites étudiés est très vite limitant étant donné que le nombre de combinaisons de parasites augmente de façon exponentielle (*i.e.* le nombre de combinaisons est égal à 2 puissance le nombre de parasites). Avec ces modèles, le nombre maximum de parasites qu'il est

raisonnablement possible d'étudier simultanément est de 10, soit 1024 combinaisons exclusives de parasites, ce qui nécessite tout de même beaucoup plus d'individus échantillonnés. Or l'étude simultanée de 10 parasites apparaît ne pas être suffisante pour représenter la réalité multiparasitaire mise en évidence, notamment, par le développement de nouveaux outils de détection (*e.g.* détection haut débit, génomique, métagénomique, pyroséquençage, multiplex, Cox-Foster *et al.* 2007, Porreca *et al.* 2007, Ellegren 2008, Vayssier-Taussat *et al.* 2013, Lecuit & Eloit 2014, Minard *et al.* 2014) et les nouvelles problématiques « omiques », *e.g.* pathobiome (Vayssier-Taussat *et al.* 2014), microbiome (Keesing *et al.* 2010), virome (Bosch *et al.* 2013). A l'évidence, l'étude du multiparasitisme doit se placer à une échelle qui concerne bien plus que 10 parasites (cf. **Chapitre 1**).

Une voie possible d'amélioration des outils développés pendant ma thèse, serait le changement du paradigme choisi. L'idée serait de passer du raisonnement en combinaisons de parasites, que nous avons adopté, à celui limité aux associations entre deux, voire trois parasites. Le raisonnement en combinaisons permet d'étudier toutes les associations potentielles jusqu'aux associations d'ordre équivalent au nombre de parasites étudiés. La principale raison qui pousse à limiter l'étude, comme nous l'indiquons, est le fait qu'il est très complexe de concevoir biologiquement les interactions d'ordre supérieur à trois. Certains auteurs supposent que les interactions d'ordre supérieur à deux sont dues essentiellement à des facteurs de risque communs entre les parasites (Hellard *et al.* 2012, Herrmann *et al.* 2013).

Concernant la méthode de screening, nous pourrions limiter l'étude aux associations d'ordre deux en utilisant des pondérations (Kierner *et al.* 2007, Chen 2009). Par exemple, lors de l'étude de trois parasites A, B et C, si on ne considère que les interactions 2 à 2, la triple interaction potentielle ABC peut être gérée en pondérant chaque paire d'un facteur 1/3. Ainsi, si nous avons, dans le jeu de données, 15 individus qui sont infectés par ABC, alors on considère que chaque paire de parasites (*i.e.* AB, BC et AC) aura 5 individus, tirés au hasard, en plus de son effectif propre. Cependant, dans ce cas, les facteurs associés aux individus, comme le sexe, l'âge, ne pourront être pris en compte. Cette condition pose des problèmes pour pouvoir distinguer les associations des interactions de parasites (cf. **Chapitre 1**). L'avantage principal de cette stratégie est que le nombre d'individus nécessaires est moindre, par rapport au nombre nécessaire lors de l'étude de toutes les associations possibles, tout en conservant une bonne puissance statistique.

Les interactions d'ordre supérieur à deux font écho à la notion de réseaux de parasites (ou communauté de parasites, Esch *et al.* 1990, Poulin 1995). Il est alors possible de rapprocher

l'épidémiologie de l'écologie, domaine où de nombreuses interactions multipartites sont observées (*e.g.* fourmis – bactéries – champignons, Currie *et al.* 2003). En écologie, de nombreuses approches méthodologiques ont été mises au point, comme par exemple des méthodes de réseaux, pour étudier, notamment, les réseaux trophiques (Fortuna & Bascompte 2008, Lafferty *et al.* 2008, Poulin 2010, Newman 2011). Les méthodes de réseaux sont également largement développées en protéomique, pour étudier les interactions protéines – protéines (Melián & Bascompte 2002, Jansen *et al.* 2003, Ideker & Krogan 2012). Les phénomènes d'actions et de rétroactions des différents organismes ou molécules peuvent être étudiés grâce à ces modèles. Les méthodes de réseaux, utilisant comme données d'entrée directement les parasites, existent déjà (Poisot *et al.* 2013, Griffiths *et al.* 2014). Lorsqu'on étudie moins de 10 parasites, les résultats issus de la projection des parasites sont non-informatifs, car il y a trop peu de données, nous l'avons donc écartée de nos analyses (Csardi & Nepusz 2006). Cependant, quand il y a plus de 10 parasites dans le jeu de données étudié, les conclusions obtenues ont un sens biologique. Cependant, les réseaux sont des modèles utilisés essentiellement pour étudier les phénomènes à une échelle globale où l'isolation de phénomènes particuliers, comme l'identification d'interactions précises au sein du réseau, n'est pas forcément une voie d'étude très développée. De plus, les analyses statistiques et les études des propriétés des réseaux ne sont pas encore très développées. La difficulté vient de la façon de construire le réseau et notamment l'hypothèse nulle servant aux analyses statistiques. Nous avons adapté les réseaux à l'épidémiologie, cependant, il ne s'agit pas d'une complète analogie avec l'écologie. Les centres d'intérêt entre l'épidémiologie et l'écologie diffèrent. En écologie, la création d'un modèle nul cible les relations entre les nœuds avec la création de liens au hasard. En épidémiologie, le modèle nul cible la matrice d'entrée où sont décrites les relations entre les parasites et les hôtes. Une nouvelle matrice est créée représentant les relations entre les parasites et les hôtes sous l'hypothèse d'indépendance entre les parasites. Pour combler cette différence entre l'écologie et l'épidémiologie, il faudrait changer de paradigme, en épidémiologie, pour pouvoir implémenter directement les hypothèses sur le réseau sans devoir passer par la matrice des observés. Pour l'instant les réseaux sont utilisés pour répondre à d'autres problématiques plus proches de l'écologie, comme par exemple, l'identification des hôtes ou parasites centraux dans le réseau observé, *i.e.* identification des hôtes super-disperseurs ou attracteurs et des parasites dominants (Meyers *et al.* 2005, Meyers *et al.* 2006, Bifulchi *et al.* 2013, Godfrey 2013).

2. Les facteurs de risque communs: une source d'homogénéité et d'hétérogénéité, un défi méthodologique

Les co-occurrences de parasites peuvent résulter de facteurs de risque communs qui créent des associations statistiques entre les parasites sans qu'il y ait pourtant de réelles interactions biologiques entre eux. Comme nous l'avons vu dans le **Chapitre 1**, les facteurs de risque communs peuvent favoriser ou inhiber les associations de parasites à différents niveaux (individus, populations, communautés) et à différentes échelles (spatiales, temporelles). Ils peuvent concerner des facteurs liés aux hôtes ou aux parasites, La principale difficulté reste que nous ne pourrions prendre en compte que les facteurs identifiés et mesurés (Guernier *et al.* 2004, Salvador *et al.* 2011). Il y aura donc toujours un risque que des facteurs de risque communs interviennent sans que nous sachions les identifier et les mesurer. Le principal risque est de conclure, au vu de résultats d'associations significatifs, à la présence d'interactions entre parasites alors qu'il n'y en a pas.

La prise en compte des facteurs de risque communs, dans l'étude des interactions multiparasitaires, peut être réalisée suivant différentes méthodes.

Si on a identifié et mesuré les facteurs de risque communs, il est alors possible d'utiliser le test du « chi-deux corrigé » développé par Hellard *et al.* (2012). Cette méthode combine une régression logistique et un test du chi-deux, afin de calculer les fréquences attendues des individus coinfectés, si les parasites sont indépendants, tout en considérant leurs facteurs de risque communs. Les approches bayésiennes sont également une solution envisageable étant donné leur capacité à tenir compte des informations biologiques *a priori*, afin d'estimer plus finement le phénomène étudié. Cette capacité des approches bayésiennes en fait de potentielles méthodes capables de faire la distinction entre des associations et des interactions de parasites. Cependant, les études des propriétés, des modèles bayésiens, sont complexes à mettre en œuvre, étant donné qu'au niveau conceptuel ces approches ne sont pas faites pour faire des tests statistiques mais pour estimer des paramètres. Cela a pour conséquence le faible développement d'études de puissances adaptées (*e.g.* épidémiologie génétique : Wakefield 2007). La méthode du GLM a également la capacité de prendre en compte les facteurs de risque communs (McCullagh & Nelder 1989, Yee & Wild 1996, Agresti 2002). L'utilisation des autres méthodes, comme le modèle de screening des associations ou les réseaux, est possible à condition de scinder le jeu de données en sous-populations homogènes suivant les facteurs disponibles (*e.g.* même sexe, même âge, même localisation). Cela pose bien évidemment un problème de puissance si les effectifs ne sont pas suffisants.

Si par contre on n'a pas identifié et mesuré les facteurs de risque communs, l'utilisation des chaînes de Markov cachées, présentées comme de simples réseaux dynamiques bayésiens (Baum & Petrie 1966, Baum & Eagon 1967, Baum & Sell 1968, Baum *et al.* 1970, Baum 1972) pourrait également être une possibilité pour détecter la présence de facteurs de risque communs. Cette potentielle voie de recherche a déjà été explorée et semble avoir des perspectives intéressantes. Des modèles de chaînes de Markov cachées ont déjà été utilisés pour détecter, à partir de données issues d'études longitudinales, les interactions entre divers agents pathogènes (*e.g.* Sherlock *et al.* 2013). De plus, contrairement aux autres approches bayésiennes, il est possible de comparer les différents modèles de chaînes de Markov cachées entre eux grâce à des indices comme le BIC, *i.e.* Critère d'Information Bayésien ou l'AIC, *i.e.* Critère d'Information d'Akaike (Akaike 1974, Schwarz 1978).

3. L'étude des cas de non-indépendance entre les individus hôtes : l'exemple de la contagion

L'indépendance entre les individus hôtes est une hypothèse importante dans les modèles statistiques et probabilistes que nous avons étudiés. Pour respecter cette hypothèse, nous avons travaillé sur des parasites à transmission vectorielle. Leur paramètre de transmission est dépendant de la fréquence des parasites (McCallum *et al.* 2001). Or, de nombreux parasites sont à transmission directe (dépendant de la densité des hôtes, McCallum *et al.* 2001), favorisant alors la non-indépendance des individus et étant notamment à l'origine de formation d'agrégats d'individus infectés. Les individus hôtes sont alors dépendants les uns des autres spatialement ou socialement (*i.e.* l'environnement biotique ou abiotique proche des hôtes est contaminé, Godfrey 2013).

Si on veut pouvoir prendre en compte et tester cette hypothèse de non-indépendance entre les individus hôtes étudiés, il est nécessaire d'avoir des statistiques de test adaptées. L'utilisation des modèles de chaînes de Markov est également envisageable pour étudier le phénomène de contagion, notamment de par leur construction (*i.e.* mémoire courte des événements) représentant au mieux la non-persistance des parasites (Norris 1998). Cependant, la contagion, liée notamment au R_0 , paramètre épidémiologique d'importance qui correspond au taux de reproduction de base des parasites (*i.e.* nombre moyen de cas secondaires générés par un hôte durant la période où il est infectieux) est difficile à aborder lors de l'analyse de données issues d'études transversales où aucune information temporelle n'est disponible. Se

placer dans le cadre d'études longitudinales semble plus approprié si on veut étudier les cas de non-indépendance entre les individus hôtes.

4. La prise en compte de l'aspect dynamique des infections

L'aspect dynamique des infections est difficile à aborder lors de l'analyse de données issues d'études transversales alors que l'on sait que les infections sont, par essence, des processus dynamiques. Or, une grande majorité des études épidémiologiques capture des instantanés des associations sur de courtes périodes de temps (Croft *et al.* 2004, Pike *et al.* 2008). Les études épidémiologiques peuvent également être un agrégat d'ensemble d'observations sur une période de temps plus longue (Lusseau *et al.* 2003, 2006). Pour notre part, nous nous sommes placés dans le cas d'études transversales. Pour contourner le problème de l'évolution dynamique des infections, nous nous sommes placés à l'état de l'équilibre ou de la stationnarité de l'infection. Cela permet de pouvoir tenir compte de l'« historique individuel » des hôtes, tout en utilisant des données transversales. Nous avons donc fait une hypothèse forte en considérant que les prévalences des parasites restent relativement stables au cours du temps.

Malgré notre choix de se placer sous l'hypothèse de stationnarité, nous avons bien conscience que les communautés de parasites sont complexes et suivent, dans la plupart du temps, des conditions de non-équilibre (Rohde 2006, Poulin 2007). Cette hypothèse permet de faire entrer le temps dans les modèles utilisant des données issues d'études transversales. Cependant, cette adaptation restera toujours moins précise qu'une étude longitudinale. Cette hypothèse de stationnarité est obligatoire lors de l'analyse de données issues d'études transversales, elle permet de pouvoir extrapoler les conclusions obtenues. Les agents pathogènes persistants sont sans doute plus sujets à la stationnarité. Pour valider nos conclusions, il est possible de faire de multiples études transversales (avec les mêmes conditions abiotiques et biotiques) et d'en comparer les résultats. Si leurs résultats sont identiques alors l'état stationnaire est atteint, sinon, on est dans l'état transitoire, état qui ne permet pas de conclure étant donné qu'on est dans une phase intermédiaire instable. Les données issues des études longitudinales semblent les plus appropriées pour étudier l'aspect dynamique des infections car elles permettent d'avoir des informations sur les fluctuations environnementales (*e.g.* climat, ressources) et les variations du statut infectieux des hôtes (*e.g.* Kosoy *et al.* 2004, Sherlock *et al.* 2013).

5. La sensibilité et la spécificité des méthodes de détection des parasites

Pour étudier les associations entre parasites dans les populations, nous nous sommes basés sur les prévalences observées de parasites. Nous avons considéré que la sensibilité de détection de chacun des parasites était la même. Or il est très probable que les probabilités de détection ne soient pas les mêmes pour les différents parasites. Le fait que nous nous soyons basés sur des détections spécifiques de chaque agent pathogène limite sans doute ce biais-là. Cependant, on ne connaît pas bien les variations des sensibilités des outils développés pour répondre aux nouvelles problématiques « omiques » et qui permettent d'effectuer des détections simultanées de plusieurs parasites. La probabilité de détection est probablement liée à l'abondance du parasite dans l'échantillon aux dépens des parasites plus minoritaires (*e.g.* *Wolbachia*, Minard *et al.* 2014). Cependant, l'effet du parasite sur l'hôte ou sur un autre parasite n'est pas forcément proportionnel à son abondance. L'idéal serait de pouvoir mesurer les probabilités de détection de chaque parasite afin de pouvoir les prendre en compte dans les modèles. Ceci pourrait être fait par des méthodes de type pondération (Poulin 1998), ou renseignement d'*a priori* dans des modèles bayésiens. Cependant, si chaque parasite a un taux de détection différent cela va poser un problème lors de l'estimation des paramètres. Un compromis va s'installer entre estimation du taux de détection et estimation de la prévalence du parasite (*e.g.* Bord *et al.* 2014). Pour pallier à ce problème, il est possible d'effectuer des expériences préliminaires pour acquérir une connaissance *a priori* sur le taux de détection des parasites par exemple.

De plus, même si les techniques moléculaires deviennent de plus en plus fiables avec leurs marqueurs spécifiques (*e.g.* PCR ou Réaction en Chaîne par Polymérase, Zarlenga & Higgins 2001, Wimmer *et al.* 2004, Gasser *et al.* 2008, la détection d'helminthes : Bott *et al.* 2009, ou de tiques : Gómez-Díaz *et al.* 2010), une incertitude persiste (*i.e.* problème de spécificité). À ceux-ci s'ajoute un autre problème majeur lié à la détection de parasites dans un échantillon. Dans nos études, nous nous sommes basés sur la détection de l'ADN des parasites. Or l'ADN et les anticorps ne renseignent pas forcément sur la présence de formes infectieuses, mais ces traces laissent à penser que l'individu hôte a été au contact des parasites et qu'ils peuvent encore interagir *via* la mémoire immunitaire des hôtes (*e.g.* immunité à long terme *via* la mémoire centrale contre *Leishmania major*, Zaph *et al.* 2004). Il est possible alors d'utiliser des méthodes basées sur la détection de l'ARN pour être sûr de détecter des cellules vivantes, étant donné que cette molécule est utilisée comme un support intermédiaire d'informations et que sa durée de vie est beaucoup plus courte que celle de l'ADN, de l'ordre de la minute.

6. Utilisations concrètes de nos connaissances sur le multiparasitisme pour gérer au mieux les parasites

Développer l'utilisation des méthodes, mises au point pour détecter des associations ou des interactions entre parasites dans divers jeux de données, permettrait d'accroître nos connaissances sur cette réalité multiparasitaire. Les méthodes sont alors à considérer plus comme des outils de réflexion, le choix des méthodes à utiliser dépendant des informations disponibles et des problématiques posées. Au vu des connaissances acquises, il nous sera alors possible d'adapter notre comportement. Par exemple, lors de l'utilisation de la méthode de screening (cf. **Chapitre 2**), nous avons mis en évidence des associations entre : 1) *B. doshiae* et *B. microti*, qui semblent être associées négativement et 2) *T. parva*, *T. mutans* et *T. velifera*, qui semblent être associées positivement. Il serait donc intéressant d'aller plus loin dans l'étude des phénomènes qui régissent ces associations afin de savoir si ces parasites ne sont pas plutôt en interaction, respectivement antagoniste et synergique. D'autant plus que les *Theileria* sont des agents pathogènes d'importance économique majeure car elles impactent négativement la fitness des bovins. Leurs interactions pourraient jouer un rôle primordial sur leur propre virulence, comme c'est le cas pour *Trypanosoma cruzi* (Franco *et al.* 2003). Dans une autre mesure, lors de l'étude sur les liens entre les bactéries du genre *Bartonella* et *Borrelia* (cf. **Chapitre 3**), notre modèle trouve que ces deux bactéries ne sont pas en interaction. Or les tiques transmettent d'autres agents pathogènes qui sont susceptibles d'interagir. Il serait alors intéressant d'utiliser cette nouvelle approche sur d'autres couples d'agents pathogènes, afin de mettre à jour les diverses interactions potentielles, permettant ainsi, à terme, d'adapter et d'améliorer l'efficacité des soins lors de coinfections.

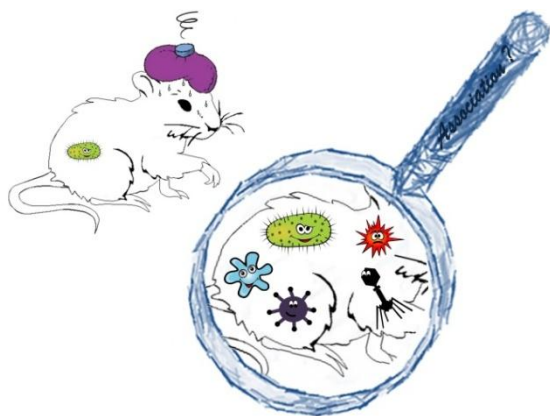
L'utilisation concrète des connaissances sur le multiparasitisme a permis le développement de nombreuses applications. Par exemple, en santé humaine, les interactions négatives entre la microflore intestinale et des agents pathogènes a permis la mise au point des probiotiques (Sleator 2010). Ces connaissances ont également permis d'améliorer les vaccins contre les maladies infectieuses (Khader & Kolls 2014) et de proposer des solutions alternatives aux antibiotiques avec notamment le développement des phagothérapies (Inal 2003, Efrony *et al.* 2009, Roossinck 2011). La connaissance et l'analyse du multiparasitisme ne peut que progresser si les études médicales, vétérinaires et agronomiques sont associées aux études statistiques. En effet, l'association des études de cas concrets et des études théoriques permettra de ne plus se restreindre aux cas emblématiques (*e.g.* VIH/tuberculose, Sester *et al.* 2010, ou malaria/helminthes, Nacher 2011) et d'identifier de nombreuses

perspectives de recherches. Ainsi, l'installation de la chronicité chez certains malades (*i.e.* passage de la phase aiguë à la phase chronique) peut être une des conséquences de multi-infections (*e.g.* la modulation immunitaire par les helminthiases permet la persistance des infections virales, Kamal & El Sayed Khalifa 2006). L'inefficacité des traitements chez des patients multi-infectés peut être due à de potentielles interactions entre ses parasites (*e.g.* patients atteints par des maladies transmises par les tiques, Swanson *et al.* 2006).

Suivant si on se place au niveau des individus hôtes (*i.e.* le malade – symptôme) ou des populations d'hôtes (*i.e.* la maladie – incidence) lors des observations, des analyses et de la gestion du multiparasite, ses impacts et ses conséquences diffèrent de façon non négligeable. Ainsi, lors de multi-infections, les interventions de lutte contre certains parasites, qui améliorent les résultats individuels des hôtes en réduisant la sévérité des symptômes, ont le potentiel d'accroître l'incidence de la maladie au niveau de la population par l'intermédiaire d'une augmentation de la période infectieuse de chaque parasite (Ezenwa & Jolles 2011). La disparition d'un co-parasite (atténuant ou aggravant : *e.g.* Stiehlm 2006, Specht & Hoerauf 2007, Harris *et al.* 2009), causée par exemple par une campagne de vaccination peut révéler la présence d'un autre parasite plus pathogène jusque-là absent ou silencieux. Les conséquences peuvent alors être aussi bien bénéfiques que néfastes pour les hôtes. Accroître nos connaissances sur cette réalité multiparasitaire permet donc d'obtenir de meilleures estimations des conséquences du multiparasitisme et ainsi d'adapter au mieux nos moyens de lutte et de prévention des maladies infectieuses.

Annexes

Annexe 1 : Ma Thèse en 180 secondes



Bonjour, que personne ne bouge, j'enquête sur une affaire, autrement plus mystérieuse, que celle de la chambre jaune. Il ne s'agit pas d'un crime, non, mais plus d'une bande de malfaiteurs, qui complotent pour entrer plus facilement, dans ce coffre-fort, qu'est notre organisme.

Hum...je suis sûre que vous me cachez des choses....personne n'a un petit rhume, une otite ou un début d'angine ? Si c'est le cas....sachez que vous hébergez des complices....Car les suspects sont

partout, leur principal atout est leur petite taille. Grâce à elle, notamment, ils passent incognito.... Ce qui les trahit ? Les traces qu'ils laissent sur leur passage : fièvres, douleurs articulaires, troubles respiratoires, démangeaisons et j'en passe. Ces indices sont précieux pour les démasquer. Toutefois, certains ont compris leurs erreurs, et ont mis en place des parades pour déjouer notre vigilance. Leur plan ingénieux tient en un seul mot : Association....Les démasquer devient alors plus compliqué, car ça change la donne. Ensemble ils innovent, ils deviennent créatifs, les symptômes sont différents et même parfois nouveaux. Ils peuvent ainsi contrer nos méthodes de lutte : médicaments et vaccins ne leur font plus peur. Ils en deviennent autrement plus dangereux.

Cependant, l'heure n'est pas si grave, vous savez ! En effet il existe des justiciers de l'ombre, qui comme nous luttent contre ces malfaiteurs. Ils portent les mêmes noms qu'eux : virus, bactéries, champignons, mais leur aide nous est précieuse. Ca me rappelle...cette histoire de contentieux qui opposait, l'inoffensif et peu connu virus de l'hépatite G, à celui du SIDA. J'en ai oublié la cause...mais les conséquences ont été dramatiques pour le virus du SIDA...c'est à peine s'il a survécu....C'est très positif pour le malade, beaucoup moins pour le virus... Ainsi chacun possède des ennemis préférentiels. Donc à chaque fois que l'on enquête sur un méfait, on risque de tomber nez à nez sur eux. Amis, Ennemis, la question se pose à chaque fois. Et heureusement, car une erreur de jugement peut être fatale. Pour avancer dans mon enquête, je suis donc remontée à l'origine du problème, et je me suis posée une question : qui est associé avec qui ?

Pour élucider ce mystère, les anciens comptaient sur leurs yeux et leur flair aiguisés.... Moi, j'ai mis au point un modèle mathématique, qui telle une loupe, me permet de démasquer les coupables. Ainsi nos ennemis ne sont plus invisibles, on peut donc adapter nos recherches, et les combattre efficacement. Prendre le temps d'observer la situation à la loupe, est important pour démêler le vrai du faux. Cette loupe est bien pratique, mais elle manque parfois de netteté.

Pouvoir répondre à la question : qui est associé avec qui n'est qu'un début. D'autres questions se posent immédiatement après, par exemple, qui fait quoi, comment, où, quand, ... La liste est longue, c'est pourquoi j'ai travaillé sur d'autres modèles de loupes plus grossissantes... Mais la précision a un prix...je ne peux les utiliser qu'une fois que j'ai identifié les protagonistes. Elles me permettent de mener à bien mon interrogatoire, pour tirer au clair cette affaire. Élémentaire, mon cher Watson.

Annexe 2 : Programme R de la fonction pour appliquer l'approche de screening des associations

```

library(boot)
#
FctTestScreenENV <- function(tabx) {
  xNS <- 5000
  xNH <- dim(tabx)[1]
  xNP <- dim(tabx)[2]
  xpv <- apply(tabx,2,sum)/xNH
  xNC <- 2*xNP
# Data structuring for a multinomial with NC combinations
  DatXMul <- array(rep(0,xNC*xNP),c(xNC,xNP))
  for ( k in 1:xNP ) {
    k1 <- 2*(xNP-k)
    k2 <- 2*(k-1)
    DatXMul[,k] <- rep( c(rep(1,k1),rep(0,k1)) ,k2 )
  }
#
  DatFMul <- rep(0,xNC)
  for ( k in 1:xNC ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[k,j] == 1 ) {
        x <- x+(10*(xNP-j)) }
    }
    DatFMul[k] <- x
  }
# Calculation of prevalence of combinations under H0
  xpvcomb <- rep(0.0,xNC)
  for ( i in 1:xNC ) {
    x <- 1.0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[i,j] == 1 ) {
        x <- x*(xpv[j]) } else {
          x <- x*(1.0-xpv[j]) }
    }
    xpvcomb[i] <- x
  }
# Calculation of theoretical sample sizes for each combination
  xeffEstcomb <- xpvcomb*xNH
# Calculation of observed sample size for each combination
  taby <- array(rep(0,xNH*xNC),c(xNH,xNC))
  for ( i in 1:xNH ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( tabx[i,j] == 1 ) {
        x <- x+(10*(xNP-j)) }
    }
    z <- (1:xNC)[(DatFMul==x)]
    taby[i,z] <- 1
  }
  xeffObscomb <- apply(taby,2,sum)
# Statistic of the screening under H0
  xresCountH0Qinf <- rep(0.0,xNC)
  xresCountH0Qsup <- rep(0.0,xNC)
  xresCountH0 <- array(rep(0.0,xNC*xNS),c(xNC,xNS))
# Simulation of kth dataset
  for ( k in 1:xNS ) {
    xdata <- t(rmultinom(xNH, 1, prob=xpvcomb))
    # Recuperation of sample sizes for each combination
    xresCountH0[,k] <- apply(xdata,2,sum)
  }
# Calculation of 95% CI of the statistic under H0
# [ Confidence Envelopes for Curves ]
  ConfianceGlobal <- 0.95
  resenv <- envelope(mat = t(xresCountH0), level =
ConfianceGlobal)
  xresCountH0Qsup <- resenv$overall[1,]
  xresCountH0Qinf <- resenv$overall[2,]

# Calculation of P-value
#####
# WARNING : We work with discrete data (i.e. many
values are identical) so the calculation of the p-value should
be used with caution
#####
xresScr <- rep(0,xNC)
# xresPvalue <- rep(0,xNC) # WARNING
# minPvalue0 <- 1.00 # WARNING
# minPvalue1 <- 0.05 # WARNING
for ( i in 1:xNC ) {
  xobs <- xeffObscomb[i]
  x <- xresCountH0[i,]
  if ( (xobs > xresCountH0Qsup[i]) ) {
    xresScr[i] <- 1
    # xresPvalue[i] <- length(x[(x>=xobs)])*2.0/xNS
    # WARNING
    # if ( xresPvalue[i] < minPvalue1 ) { minPvalue1 <-
xresPvalue[i] } # WARNING
  }
  if ( (xobs < xresCountH0Qinf[i]) ) {
    xresScr[i] <- 1
    # xresPvalue[i] <- length(x[(x<=xobs)])*2.0/xNS
    # WARNING
    # if ( xresPvalue[i] < minPvalue1 ) { minPvalue1 <-
xresPvalue[i] } # WARNING
    # if ( xresScr[i] == 0 ) { # WARNING
    # if ( xobs < median(x) ) { # WARNING
    # xresPvalue[i] <- length(x[(x<=xobs)])*2.0/xNS
    # WARNING
    # if ( xresPvalue[i] > 1.0 ) xresPvalue[i] <-
xresPvalue[i]/2.0 # WARNING
    # if ( xresPvalue[i] < minPvalue0 ) { minPvalue0 <-
xresPvalue[i] } # WARNING
    # } else { # WARNING
    # xresPvalue[i] <- length(x[(x>=xobs)])*2.0/xNS
    #
  }
  WARNING
  # if ( xresPvalue[i] > 1.0 ) xresPvalue[i] <-
xresPvalue[i]/2.0 # WARNING
  # if ( xresPvalue[i] < minPvalue0 ) { minPvalue0 <-
xresPvalue[i] } # WARNING
  # } } # WARNING
}
resScr <- sum(xresScr)
if ( resScr != 0 ) {
  resTest <- list(resScr,
# minPvalue1, # WARNING
DatFMul,xresScr,
# xresPvalue, # WARNING
xeffObscomb,xresCountH0Qsup,xresCountH0Qin
f) } else {
  resTest <- list(resScr,
# minPvalue0, # WARNING
DatFMul,xresScr,
# xresPvalue, # WARNING
xeffObscomb,xresCountH0Qsup,xresCountH0Qin
f) }
resTest
}

```


Annexe 3 : Procédure d'utilisation sous R de la fonction pour appliquer l'approche de screening des associations

Mise en forme des données pour l'analyse :

Individus hôtes	Parasite 1	Parasite 2
1	0	1
2	0	0
3	0	0
4	1	0

N.B. Le tableau ne doit comporter que des « 0 » ou des « 1 »,
avec 0 : non infecté et 1 : infecté

```
# Analyse du jeu de donnée : "Jeu_de_donnees.txt" et les colonnes concernant les parasites : "ZZ"
# Chargement des bibliothèques nécessaires pour le calcul de l'enveloppe de confiance à 95 % :
library(boot)
# Fonction utilisée :
source("FctTestScreenENV.txt")
# Initiation pour les tirages aléatoires :
set.seed(100)
# Données initiales :
Xdat <- read.delim("Jeu_de_donnees.txt")
# Isoler les colonnes ne concernant que les présences/absences des parasites
Xtab <- as.matrix(Xdat[,c(ZZ:ZZ)] )
# Structure de sauvegarde des résultats :
ResSCRENV <- FctTestScreenENV(Xtab)
ResSCRENV[[1]]      # test significatif si > 0
ResSCRENV[[2]]      # p-value
# Construction du graphique
xNC <- length(ResSCRENV[[3]])
x <- (1:xNC)
yinf <- ResSCRENV[[8]]
ysup <- ResSCRENV[[7]]
yobs <- ResSCRENV[[6]]
plot(x,yobs,type="n",ylim=range(c(0.0,yinf,ysup,yobs)),xlab="indice_de_combinaison",ylab="effectif",main="Jeu_de_donnees")
lines(x,yinf,lty=1,col=4,lwd=2)
lines(x,ysup,lty=1,col=3,lwd=2)
points(x,yobs,col=2)
valx <- x[(ResSCRENV[[4]]!=0)]
for (i in 1:length(valx)) {abline(v=valx[i],lty=3,col=1,lwd=1)}
# Combinaisons significatives – observés – IC (inf-sup) – p-values
cbind(ResSCRENV[[3]][valx],ResSCRENV[[6]][valx],ResSCRENV[[8]][valx],ResSCRENV[[7]][valx],ResSCRENV[[5]][valx])
# Ensemble des combinaisons avec les observés, IC (inf-sup) et p-values
cbind(ResSCRENV[[3]],ResSCRENV[[6]],ResSCRENV[[8]],ResSCRENV[[7]],ResSCRENV[[4]],ResSCRENV[[5]])
# Prévalences des parasites étudiés
round(apply(Xtab,2,sum)/dim(Xtab)[1]*1000)/1000
```


Annexe 4 : Programme R de la fonction pour appliquer l'approche du chi-deux généralisé

```

FctTestCHI2 <- function(tabx) {
  xNS <- 5000
  xNH <- dim(tabx)[[1]]
  xNP <- dim(tabx)[[2]]
  xpv <- apply(tabx,2,sum)/xNH
  xNC <- 2**xNP
  # Data structuring for a multinomial with NC combinations
  DatXMul <- array(rep(0,xNC*xNP),c(xNC,xNP))
  for ( k in 1:xNP ) {
    k1 <- 2**xNP-k
    k2 <- 2**k-1
    DatXMul[,k] <- rep( c(rep(1,k1),rep(0,k1)) ,k2 ) }
  #
  DatFMul <- rep(0,xNC)
  for ( k in 1:xNC ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[k,j] == 1 ) { x <- x+(10**(xNP-j)) } }
    DatFMul[k] <- x }
  # Calculation of prevalence of combinations under H0
  xpvcomb <- rep(0.0,xNC)
  for ( i in 1:xNC ) {
    x <- 1.0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[i,j] == 1 ) {
        x <- x*(xpv[j]) } else {
        x <- x*(1.0-xpv[j]) } }
    xpvcomb[i] <- x }
  # Calculation of theoretical sample sizes for each combination
  xeffEstcomb <- xpvcomb*xNH
  selkc <- ( xeffEstcomb > 5.0 )
  if ( sum(selkc) < xNC ) {
    selknc <- !selkc
    xNCmod <- sum(selkc) + 1 } else {
    selknc <- rep(0,xNC)
    xNCmod <- sum(selkc) }
  # Calculation of observed sample size for each combination
  taby <- array(rep(0,xNH*xNC),c(xNH,xNC))
  for ( i in 1:xNH ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( tabx[i,j] == 1 ) {
        x <- x+(10**(xNP-j)) } }
    z <- (1:xNC)[(DatFMul==x)]
    taby[i,z] <- 1 }
  xeffObscomb <- apply(taby,2,sum)
  # Statistics of the generalized chi-square
  xdifeff <- (xeffObscomb-xeffEstcomb)
  xchi2 <- sum((xdifeff**2)/xeffEstcomb)
  ychi2 <- ((xdifeff**2)/xeffEstcomb)
  xdnc <- (sum(xeffObscomb[selknc])-sum(xeffEstcomb[selknc]))**2
  xenc <- sum(xeffEstcomb[selknc])
  if ( sum(selkc) < xNC ) {
    xchi2mod <- sum((xdifeff[selkc]**2)/xeffEstcomb[selkc]) + (xdnc/xenc)
  } else { xchi2mod <- sum((xdifeff**2)/xeffEstcomb) }
  # Calculation of P-value and contribution
  xresCHI2mod <- 1.0-pchisq(xchi2mod,(xNCmod-1))
  alphaIndiv <- (0.05)
  x <- ychi2/xchi2
  selx <- (x>(xchi2mod/xNC))
  resTest <- list((xresCHI2mod<alphaIndiv),xresCHI2mod,xchi2mod,(xNCmod-1),DatFMul[selx],x[selx])
  resTest }

```


Annexe 5 : Programme R de la fonction pour appliquer l'approche du GLM multinomial

```

FctTestGLM <- function(tabx) {
  xNS <- 1000
  xNH <- dim(tabx)[1]
  xNP <- dim(tabx)[2]
  xpv <- apply(tabx, 2, sum)/xNH
  xNC <- 2*xNP
  # Data structuring for a multinomial with NC combinations
  DatXMul <- array(rep(0, xNC*xNP), c(xNC, xNP))
  for ( k in 1:xNP ) {
    k1 <- 2*(xNP-k)
    k2 <- 2*(k-1)
    DatXMul[,k] <- rep( c(rep(1, k1), rep(0, k2)) , k2 )
  }
  #
  DatFMul <- rep(0, xNC)
  for ( k in 1:xNC ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[k,j] == 1 ) {
        x <- x + (10*(xNP-j)) } }
    DatFMul[k] <- x }
  # Calculation of prevalence of combinations under H0
  xpvcomb <- rep(0.0, xNC)
  for ( i in 1:xNC ) {
    x <- 1.0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( DatXMul[i,j] == 1 ) {
        x <- x*(xpv[j]) } else {
          x <- x*(1.0-xpv[j]) } }
    xpvcomb[i] <- x }
  # Calculation of theoretical sample sizes for each combination
  xeffEstcomb <- xpvcomb*xNH
  # Calculation of observed sample size for each combination
  taby <- array(rep(0, xNH*xNC), c(xNH, xNC))
  for ( i in 1:xNH ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) {
      if ( tabx[i,j] == 1 ) {
        x <- x + (10*(xNP-j)) } }
    z <- (1:xNC)[(DatFMul==x)]
    taby[i,z] <- 1 }
  xeffObscomb <- apply(taby, 2, sum)
  # Statistic of the multinomial GLM under H0
  xresVraisH0 <- rep(0.0, xNS)
  xresVraisH0Qinf <- 0.0

  xresVraisH0Qsup <- 0.0
  # Simulation of kth dataset
  for ( k in 1:xNS ) {
    xdata <- t(rmultinom(xNH, 1, prob=xpvcomb))
    # Direct calculation of the statistics without factors
    vxds <- apply(xdata, 2, sum)
    selk <- (vxds!=0.0)
    resMVO <- -2.0*sum(vxds[selk]*log(vxds[selk]/xNH))
    xNC0 <- xNC - sum(selk)
    resddl <- ((xNC-1)*(xNH-1)) - (xNC0*(xNH-1))
    xresVraisH0[k] <- resMVO/resddl }
  # Calculation of 95% CI of the statistic under H0
  alphaIndiv <- (0.05)/2.0
  x <- quantile(xresVraisH0, probs=c(alphaIndiv, (1.0-alphaIndiv)))
  xresVraisH0Qinf <- x[1]
  xresVraisH0Qsup <- x[2]
  # Statistic of multinomial GLM without factors
  vxds <- apply(taby, 2, sum)

  selk <- (vxds!=0.0)
  resMVO <- -2.0*sum(vxds[selk]*log(vxds[selk]/xNH))
  xNC0 <- xNC - sum(selk)
  resddl <- ((xNC-1)*(xNH-1)) - (xNC0*(xNH-1))
  xresVrais <- resMVO/resddl
  # Calculation of P-value
  xresGLM <- 0
  xpval <- 1.0
  if ( (xresVrais > xresVraisH0Qsup) ) {
    xresGLM <- 1
    xpval <-
length(xresVraisH0[(xresVraisH0>=xresVrais)])*2.0/xNS }
  if ( (xresVrais < xresVraisH0Qinf) ) {
    xresGLM <- 1
    xpval <-
length(xresVraisH0[(xresVraisH0<=xresVrais)])*2.0/xNS }
  if ( xresGLM == 0 ) {
    if (xresVrais < median(xresVraisH0)) {
      xpval <-
length(xresVraisH0[(xresVraisH0<=xresVrais)])*2.0/xNS }
    else {
      xpval <-
length(xresVraisH0[(xresVraisH0>=xresVrais)])*2.0/xNS }
    }
  resGLM <- c(xresGLM, xpval, xresVrais)
}

```


Annexe 6 : Programme R de la fonction pour appliquer les approches de réseaux de parasites et de combinaisons

```
#library(igraph)
#
FctTestNet <- function(tabx) {
  xNS <- 1000
  xNH <- dim(tabx)[1]
  xNP <- dim(tabx)[2]
  xpv <- apply(tabx,2,sum)/xNH
  xNC <- 2**xNP
  # Data structuring for a multinomial with NC combinations
  DatXMul <- array(rep(0,xNC*xNP),c(xNC,xNP))
  for ( k in 1:xNP ) {
    k1 <- 2**(xNP-k)
    k2 <- 2**(k-1)
    DatXMul[,k] <- rep( c(rep(1,k1),rep(0,k1)), k2 )
    DatFMul <- rep(0,xNC)
    for ( k in 1:xNC ) {
      x <- 0
      for ( j in 1:xNP ) { if ( DatXMul[k,j] == 1 ) {
        x <- x+(10**(xNP-j)) } }
      DatFMul[k] <- x
    }
  }
  # Calculation of prevalence of combinations under H0
  xpvcomb <- rep(0.0,xNC)
  for ( i in 1:xNC ) {
    x <- 1.0
    for ( j in 1:xNP ) { if ( DatXMul[i,j] == 1 ) {
      x <- x*(xpv[j]) } else { x <- x*(1.0-xpv[j]) } }
    xpvcomb[i] <- x
  }
  # Calculation of theoretical sample sizes for each combination
  xeffEstcomb <- xpvcomb*xNH
  # Calculation of observed sample size for each combination
  taby <- array(rep(0,xNH*xNC),c(xNH,xNC))
  for ( i in 1:xNH ) {
    x <- 0
    for ( j in 1:xNP ) { if ( tabx[i,j] == 1 ) {
      x <- x+(10**(xNP-j)) } }
    z <- (1:xNC)[(DatFMul==x)]
    taby[i,z] <- 1
  }
  xeffObscomb <- apply(taby,2,sum)
  # Statistic of the networks under H0
  xresDens1H0 <- rep(0.0,xNS)
  xresDens1H0Qinf <- 0.0
  xresDens1H0Qsup <- 0.0
  xresDens2H0 <- rep(0.0,xNS)
  xresDens2H0Qinf <- 0.0
  xresDens2H0Qsup <- 0.0
  # Simulation of kth dataset
  for ( k in 1:xNS ) {
    xdata <- array(rep(0,xNH*xNP),c(xNH,xNP))
    for ( j in 1:xNP ) {
      xdata[,j] <- rbinom(xNH,size=1,prob=xpv[j])
    }
    ydata <- array(rep(0,xNH*xNC),c(xNH,xNC))
    for ( i in 1:xNH ) {
      x <- 0
      for ( j in 1:xNP ) { if ( xdata[i,j] == 1 ) {
        x <- x+(10**(xNP-j)) } }
      DatFMul==x
      z <- (1:xNC)[(DatFMul==x)]
      ydata[i,z] <- 1
    }
  }
  # Calculation of the network connectance
  # 1 - matrix : NH*NP
  matSim <- as.matrix(xdata)
  graphSim <- graph.incidence(matSim)
  projecSim <- bipartite.projection(graphSim)
  xresDens1H0[k] <- graph.density(projecSim[[1]])
}
```

```
# 2 - matrix : NH*NC
matSim <- as.matrix(ydata)
graphSim <- graph.incidence(matSim)
projecSim <- bipartite.projection(graphSim)
xresDens2H0[k] <- graph.density(projecSim[[1]])
# Calculation of 95% CI of the statistic under H0
alphaIndiv <- (0.05)/2.0
x <- quantile(xresDens1H0,probs=c(alphaIndiv,(1.0-alphaIndiv)))
xresDens1H0Qinf <- x[1]
xresDens1H0Qsup <- x[2]
x <- quantile(xresDens2H0,probs=c(alphaIndiv,(1.0-alphaIndiv)))
xresDens2H0Qinf <- x[1]
xresDens2H0Qsup <- x[2]
# Calculation of the statistic for: 1 - matrix : NH*NP
matSim <- as.matrix(tabx)
graphSim <- graph.incidence(matSim)
projecSim <- bipartite.projection(graphSim)
xresDens1 <- graph.density(projecSim[[1]])
# Calculation of the statistic for: 2 - matrix : NH*NC
matSim <- as.matrix(taby)
graphSim <- graph.incidence(matSim)
projecSim <- bipartite.projection(graphSim)
xresDens2 <- graph.density(projecSim[[1]])
# Calculation of P-value
xres1 <- 0
xres2 <- 0
xpval1 <- 1.0
xpval2 <- 1.0
if ( (xresDens1 > xresDens1H0Qsup) ) {
  xres1 <- 1
  xpval1 <-
length(xresDens1H0[(xresDens1H0>=xresDens1)])*2.0/xNS
}
if ( (xresDens1 < xresDens1H0Qinf) ) {
  xres1 <- 1
  xpval1 <-
length(xresDens1H0[(xresDens1H0<=xresDens1)])*2.0/xNS
}
if ( xres1 == 0 ) {
  if (xresDens1 < median(xresDens1H0)) {
    xpval1 <-
length(xresDens1H0[(xresDens1H0<=xresDens1)])*2.0/xNS
} else { xpval1 <-
length(xresDens1H0[(xresDens1H0>=xresDens1)])*2.0/xNS
} }
if ( (xresDens2 > xresDens2H0Qsup) ) { xres2 <- 1
  xpval2 <-
length(xresDens2H0[(xresDens2H0>=xresDens2)])*2.0/xNS
}
if ( (xresDens2 < xresDens2H0Qinf) ) {
  xres2 <- 1
  xpval2 <-
length(xresDens2H0[(xresDens2H0<=xresDens2)])*2.0/xNS
}
if ( xres2 == 0 ) {
  if (xresDens2 < median(xresDens2H0)) { xpval2 <-
length(xresDens2H0[(xresDens2H0<=xresDens2)])*2.0/xNS
} else { xpval2 <-
length(xresDens2H0[(xresDens2H0>=xresDens2)])*2.0/xNS
} }
resNet <- c( xres1, xpval1, xresDens1, xres2, xpval2,
xresDens2 )
resNet }
```


Annexe 7 : Présentation d'une partie des résultats du Métaprogramme INRA MEM (projet Patho-Id)

Moutailler et al. *Parasites & Vectors* 2014, **7**(Suppl 1):O15
http://www.parasitesandvectors.com/content/7/S1/O15



**Parasites
& Vectors**

ORAL PRESENTATION

Open Access

To be or not to be co-infected

S Moutailler¹, L Michelet¹, J Chotte¹, F Féménia¹, E Le Naour¹, M Cote¹, ML Poulle², E Vaumourin^{1,3}, P Gasqui³, G Vourc'h³, JF Cosson⁴, D Raoult⁵, M Vayssier-Taussat^{1*}

From The 1st Conference on Neglected Vectors and Vector-Borne Diseases (EurNegVec): with Management Committee and Working Group Meetings of the COST Action TD1303
Cluj-Napoca, Romania. 8-11 April 2014

Ticks can transmit a large spectrum of pathogens including bacteria, viruses and parasites with a significant number of these pathogens being agents of emerging infectious diseases. In Europe, the most prevalent tick-borne disease is Lyme Borreliosis, caused by the bacteria *Borrelia burgdorferi* s.l. In most cases, Lyme Borreliosis is well diagnosed. However, beside these typical cases, patients bitten by ticks can be infected by many other pathogens (bacteria: *Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp.; parasites: *Babesia* spp., *Theileria* spp.; and arboviruses: TBEV) that are more difficult to diagnose. Moreover, co-infections between several of these pathogens might also occur. Clinical surveys show that patients coinfecting by several tick-borne pathogens present more severe symptoms and a longer duration of illness than those infected by a single pathogen. The overall objective of our study was to evaluate tick-borne pathogen coinfection in ticks and the consequence of those coinfections for human health.

Using the high throughput real-time PCR chip, we detected the DNA of the 37 major tick-borne pathogens in a cohort of questing adult of *Ixodes ricinus* ticks collected in Ardennes (France). We identified that 60% of ticks were infected by at least one pathogen and half of the infected ticks were coinfecting. We then evaluated the risk for simultaneous infection of those pathogens to humans by detecting the DNA of the most prevalent tick-borne pathogens in the blood of patients bitten by ticks. Our data illustrated the importance of coinfection, and highlighted the necessity to evaluate coinfection in the context of tick-borne diseases.

Authors' details

¹UMR Bipar, Enva, Anses, USC INRA, Maisons-Alfort, France. ²URCA, SFR Cap Santé-PROTAL EA3800 et CERFE, France. ³UR 346 Epidémiologie Animale,

INRA, Saint-Genès Champanelle, France. ⁴CBGP, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France. ⁵URMITE, Université de Médecine Aix-Marseille, Marseille, France.

Published: 1 April 2014

doi:10.1186/1756-3305-7-S1-O15

Cite this article as: Moutailler et al.: To be or not to be co-infected. *Parasites & Vectors* 2014 **7**(Suppl 1):O15.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



* Correspondence: mvayssier@vet-alfort.fr

¹UMR Bipar, Enva, Anses, USC INRA, Maisons-Alfort, France

Full list of author information is available at the end of the article



Annexe 8 : Article de vulgarisation scientifique pour la région Auvergne

Identification des interactions entre deux agents pathogènes, persistants et vectorisés, dans des populations réservoirs.



De nombreuses disciplines de recherche en écologie tentent de décrypter les processus à l'origine de la co-occurrence (ou co-présence) d'espèces. En médecine et en épidémiologie, un nombre croissant d'études font état d'infections simultanées par des microorganismes. Ceux-ci peuvent être pathogènes pour de nombreux hôtes mammifères (animaux sauvages et domestiques, ainsi que l'homme, Cox 2001).

Les interactions entre agents pathogènes sont cruciales d'un point de vue médical. En effet, elles peuvent modifier la susceptibilité de l'hôte, la durée d'infection et les symptômes cliniques. D'un point de vue épidémiologique, les interactions peuvent modifier le risque infectieux. Par exemple, chez la mouche (*Drosophila melanogaster*), l'infection par la bactérie symbiotique *Wolbachia* augmente la résistance à certains agents pathogènes naturels de la drosophile, comme les virus (Teixeira *et al.* 2008).

Les associations de microorganismes, positives (la présence des uns facilite la présence des autres) ou négatives (la présence des uns inhibe la présence des autres), dues aux interactions doivent être distinguées de celles dues simplement à des facteurs confondants, tels que l'environnement, la susceptibilité comportementale et physiologique de l'hôte (âge, sexe, localisation, saison, Telfer *et al.* 2008). Par exemple chez l'homme, les associations entre l'agent du paludisme et des helminthes (ou vers) semblent être dues, plus à des facteurs sociaux ou environnementaux communs, plutôt qu'à de véritables interactions biologiques.

Du fait de leur présence simultanée chez leurs vecteurs (puces, tiques, moustiques), les agents pathogènes vectorisés peuvent être, en théorie, fréquemment transmis en même temps et donc coinfecter le même animal. Ils sont donc de bons modèles pour étudier les interactions potentielles.

Nous avons modélisé la probabilité pour un individu hôte d'être infecté par un premier agent pathogène puis par un second, en utilisant un modèle probabiliste (Vaumourin *et al.* 2013). Notre modèle a été conçu pour s'appliquer à des données transversales (données issues d'études où les individus hôtes ne sont capturés qu'une seule fois). Dans un deuxième temps, nous avons comparé notre approche de modélisation au test du Chi-deux d'indépendance, test statistique couramment utilisé pour répondre à cette problématique des coinfections.

Notre modèle a été appliqué pour détecter de potentielles interactions entre, *Borrelia afzelii*, agent de la maladie de Lyme, et *Bartonella* spp., agents de Bartonelloses humaines et animales, dans leur hôte naturel, le campagnol roussâtre. Leurs prévalences (ou proportion d'individus malades dans une population) sont respectivement de 11% et 57% chez cette

espèce de campagnol. Pour ces deux agents pathogènes, aucune interaction n'a été identifiée même si des cas d'interactions indirectes, c'est-à-dire *via* une réaction croisée du système immunitaire, ont déjà été observés chez des bactéries proches (Luft *et al.* 1993).

Le modèle que nous avons développé est plus puissant qu'un test du Chi-deux. Il permet d'identifier, mais également, de quantifier et de caractériser le sens des interactions. Une telle approche permet donc de comprendre comment les communautés d'organismes sont assemblées et structurées. Ainsi, elle répond aux besoins actuels de comprendre les relations entre agents pathogènes, afin de pouvoir développer de meilleurs contrôles et d'améliorer la prévention en santé publique.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été subventionnée par le département de Santé Animale de l'INRA (<http://www.inra.fr>), la région Auvergne (<http://www.auvergnesciences.com>), le Metaprogramme MEM (projet Patho-ID) de l'INRA et la subvention de l'UE FP7-261504 EDENext. L'article originel a été catalogué par le Comité d'EDENext comme EDENext090 (<http://www.edenext.eu>). Nous remercions également le groupe de travail «Tiques et Maladies à Tiques» du «Réseau Ecologie des Interactions Durables» pour les discussions enrichissantes.

PERSONNE A CONTACTER

Elise Vaumourin

elise.vaumourin@clermont.inra.fr

*Institut National de la Recherche Agronomique,
Centre de recherche de Clermont-Ferrand – Theix,
Unité d'Epidémiologie Animale, 63122 Saint Genès Champanelle*

BIBLIOGRAPHIE

- Cox, F. E. G. (2001). "Concomitant infections." *Parasitology* 122: S23-S38.
- Luft, B. J., J. J. Dunn, *et al.* (1993). "Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*." *Research in Microbiology* 144(4): 251-257.
- Teixeira, L., A. Ferreira, *et al.* (2008). "The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*." *PLoS Biology* 6(12): e1000002.
- Telfer, S., R. Birtles, *et al.* (2008). "Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data." *Parasitology* 135(07): 767-781.
- Vaumourin, E., P. Gasqui, *et al.* (2013). "A Probabilistic Model in Cross-Sectional Studies for Identifying Interactions between Two Persistent Vector-Borne Pathogens in Reservoir Populations." *PloS One* (*in press*).

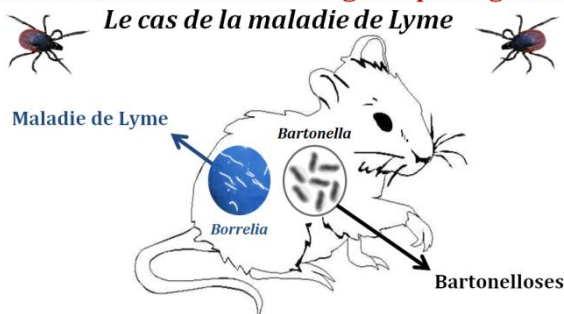
Annexe 9 : Les Faits Marquants 2013 de l'INRA en 120 secondes

UR346 – Unité d'Epidémiologie Animale

Elise Vaumourin

Un modèle statistique pour identifier les interactions entre deux agents pathogènes :

Le cas de la maladie de Lyme



Bonjour à tous,

Les interactions entre agents pathogènes sont cruciales d'un point de vue médical et épidémiologique car elles peuvent modifier le risque de transmission, la durée et la sévérité des infections, avec notamment l'apparition de symptômes atypiques. Cependant, les interactions peuvent également être bénéfiques pour les hôtes.



Par exemple, prenons le cas d'une coinfection entre les bactéries du genre *Borrelia*, agents de la maladie de Lyme, et d'une autre bactérie pathogène *Anaplasma phagocytophilum*. On sait que, chez les souris, si un individu est infecté par *Borrelia*, il ne sera alors pas infecté par *Anaplasma* et *vice versa*. Ces deux bactéries sont donc en interaction négative, ce qui est en soit plutôt une bonne nouvelle pour l'hôte.

Ainsi, comprendre les interactions entre agents pathogènes, permet d'améliorer la prévention et le contrôle des maladies infectieuses.

La majorité des modèles mathématiques qui existe ont besoin de données issues d'un suivi au cours du temps des individus hôtes. Il n'existe que peu d'outils d'analyse permettant d'utiliser des données issues d'études transversales, études où l'on observe qu'une seule fois les individus hôtes. Or, cela correspond à la majorité des études de terrain. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de développer une nouvelle approche, un modèle statistique qui permet de détecter les interactions entre deux agents pathogènes et d'identifier si elles sont positives ou négatives.

On sait que les tiques transmettent divers agents pathogènes qui sont susceptibles d'interagir. Nous avons choisi d'en étudier deux en particulier : *Borrelia* qui est l'agent de la maladie de Lyme et *Bartonella* qui est l'agent des Bartonelloses. Leurs interactions pourraient notamment être à l'origine de la persistance de la maladie de Lyme chez les patients coinfectés. Or notre modèle trouve que ces deux bactéries n'interagissent pas. Ce résultat apporte une information importante : la persistance de la maladie de Lyme a une autre origine. D'ailleurs d'autres pistes potentielles sont en cours d'étude actuellement.

Concernant nos travaux, nous voulons utiliser notre modèle sur d'autres couples d'agents pathogènes, afin de mettre à jour les diverses interactions potentielles, permettant ainsi d'adapter et d'améliorer l'efficacité des soins lors de coinfections.

Je vous remercie pour votre attention et reste à votre disposition si vous avez des questions.

Annexe 10 : Programme R des fonctions pour estimer les probabilités du modèle

```
fctModelEstimeProba <- function( px ) {
  # function to estimate the model probabilities
  # input data:
  p1 <- exp(-exp(px[1]))
  p2 <- exp(-exp(px[2]))
  q1 <- exp(-exp(px[3]))
  q2 <- exp(-exp(px[4]))
  # Weights of infection Wa:
  # JUVENILES
  ap <- exp(px[5])
  # ADULTS
  aq <- exp(px[6])
  # Weights of infection Wb:
  # JUVENILES
  bp <- ap*(1.0-p2)/((1.0-p1)+(ap*(p1-p2)))
  # ADULTS
  bq <- aq*(1.0-q2)/((1.0-q1)+(aq*(q1-q2)))
  # New variables:
  app2 <- ap*p2
  bpp1 <- bp*p1
  aqq2 <- aq*q2
  bqq1 <- bq*q1
  # calculation of the estimated probabilities:
  # JUVENILES
  vKJ <- 1.0 - ((app2-p2)*(bpp1-p1))
  PJE <- rep(0.0,4)
  # E1:0 et E2:0
  x <- 0.0
  x <- (1.0-p1)*(1.0-p2)
  x <- x + ((p1-bpp1)*app2*(1.0-p2))
  x <- x / vKJ
  PJE[1] <- x
  # E1:0 et E2:1
  x <- 0.0
  x <- (1.0-p1)*p2
  x <- x + (p2*app2*(1.0-bpp1))
  x <- x - (p2*app2*(1.0-p1))
  x <- x / vKJ
  PJE[2] <- x
  # E1:1 et E2:0
  x <- 0.0
  x <- (1.0-p2)*p1
  x <- x + (p1*bpp1*(1.0-app2))
  x <- x - (p1*bpp1*(1.0-p2))
  x <- x / vKJ
  PJE[3] <- x
  # E1:1 et E2:1
  x <- 0.0
  x <- (bpp1*p2)
  x <- x + (bpp1*p1*app2)
  x <- x - (bpp1*p1*p2)
  x <- x / vKJ
  PJE[4] <- x
  # ADULTS
  vKA <- 1.0 - ((aqq2-q2)*(bqq1-q1))
  PAE <- rep(0.0,4)
  # F1:0 et F2:0
  x <- 0.0
  x <- (1.0-q1)*(1.0-q2)
  x <- x + ((q1-bqq1)*aqq2*(1-q2))
  x <- x / vKA
  x <- x*PJE[1]
  PAE[1] <- x
  # F1:0 et F2:1
  x <- 0.0
  x <- (1.0-q1)*q2
```

```

  x <- x + (q2*aqq2*(1-bqq1))
  x <- x - (q2*aqq2*(1-q1))
  x <- x / vKA
  x <- x*PJE[1]
  x <- x + ((1-bqq1)*PJE[2])
  PAE[2] <- x
  # F1:1 et F2:0
  x <- 0.0
  x <- (1.0-q2)*q1
  x <- x + (q1*bqq1*(1-aqq2))
  x <- x - (q1*bqq1*(1-q2))
  x <- x / vKA
  x <- x*PJE[1]
  x <- x + ((1-aqq2)*PJE[3])
  PAE[3] <- x
  # F1:1 et F2:1
  x <- 0.0
  x <- (bqq1*q2)
  x <- x + (bqq1*q1*aqq2)
  x <- x - (bqq1*q1*q2)
  x <- x / vKA
  x <- x*PJE[1]
  x <- x + (bqq1*PJE[2]+aqq2*PJE[3]+PJE[4])
  PAE[4] <- x
  # output data:
  res <- list(PJE,PAE)
  res} # END : fctModelEstimeProba

fctModelVariable <- function( px ) {
  # function to implement MG or SM
  # input data:
  # parameter vector: px
  # example SM without interaction:
  # Wprob <- fctModelEstimeProba(px[1:4],log(1.0),log(1.0))
  # for General model: MG
  Wprob <- fctModelEstimeProba(px)
  # output data:
  Wprob} # END : fctModelVariable

fctMVMG <- function(px, xDS) {
  # function for calculation -log( Likelihood )
  # Modified function of likelihood :
  # have been retained, only the terms that depend on the parameters
  # input data:
  x <- xDS[[1]]
  YJTobs <- x[1]
  YATobs <- x[2]
  YJobs <- xDS[[2]]
  YAobs <- xDS[[3]]
  # calculation of the estimated probabilities:
  Xprob <- fctModelVariable(px)
  ZJest <- Xprob[[1]]
  ZAest <- Xprob[[2]]
  # calculation of the criterion to be minimized:
  resMV <- 0.0
  # JUVENILES
  for ( i in 1:4 ) {
    # estimator of -log( Likelihood ):
    resMV <- resMV - (YJobs[i]*log(ZJest[i]))
  }
  # ADULTS
  for ( i in 1:4 ) {
    # estimator of -log( Likelihood ):
    resMV <- resMV - (YAobs[i]*log(ZAest[i]))
  }
  # output data:
  resMV} # END : fctMV
```


Annexe 11 : Procédure d'utilisation sous R des fonctions pour estimer les probabilités du modèle

Mise en forme des données pour l'analyse :

Pour les jeunes

		Parasite 2	
		0	1
Parasite 1	0	NJ00	NJ01
	1	NJ10	NJ11

Total = NJT

Vecteurs: NJ = c(NJ00,NJ01,NJ10,NJ11) et NA = c(NA00,NA01,NA10,NA11)

Pour les adultes

		Parasite 2	
		0	1
Parasite 1	0	NA00	NA01
	1	NA10	NA11

Total = NAT

Format des données de sortie

Pour les jeunes

		Parasite 2	
		0	1
Parasite 1	0	NJE00	NJE01
	1	NJE10	NJE11

Total = NJET

Vecteurs: NJE = c(NJE00,NJE01,NJE10,NJE11) et NAE = c(NAE00,NAE01,NAE10,NAE11)

Pour les adultes

		Parasite 2	
		0	1
Parasite 1	0	NAE00	NAE01
	1	NAE10	NAE11

Total = NAET

Chargement des données initiales (en utilisant les données observées)

JEUNES

NJO <- c(*X,X,X,X*)

NJT <- *X*

ADULTES

NAO <- c(*X,X,X,X*)

NAT <- *X*

NJE <- c(0.0,0.0,0.0,0.0)

NAE <- c(0.0,0.0,0.0,0.0)

Estimation par Maximum de Vraisemblance :

source("fctModelEstimeProba.txt")

source("fctModelVariable.txt")

source("fctMVMG.txt")

Chargement des bibliothèques nécessaires

library(brew)

fctModelVariable <- *function(px) {*

 # Modèle général : MG

Wprob <- *fctModelEstimeProba(px)*

Wprob } # FIN : *fctModelVariable*

fctMVMG <- *function(px, xDS) {*

 # Données en entrée

x <- *xDS[[1]]*

YJTobs <- *x[1]*

YATobs <- *x[2]*

YJobs <- *xDS[[2]]*

YAObs <- *xDS[[3]]*

 # Calcul des probabilités estimées

Xprob <- *fctModelVariable(px)*

ZJest <- *Xprob[[1]]*

ZAest <- *Xprob[[2]]*

 # Calcul du critère à minimiser :

resMV <- 0.0

 # JEUNES

*for (i in 1:4) {resMV <- resMV - (YJobs[i]*log(ZJest[i])) }*

```
# ADULTES
for ( i in 1:4 ) {resMV <- resMV - (YAobs[i]*log(ZAest[i])) }
resMV } # FIN : fctMV
# Modèle général
xDS <- list( c(NJT,NAT), NJO, NAO)
pinit <- c( log(-log(0.50)),log(-log(0.50)),log(-log(0.50)),log(-log(0.50)),log(1.0),log(1.0) )
resNLMG <- nlm(fctMVMG, pinit, xDS, hessian=T)
resNLMG
# Interprétations des résultats via les "estimations"
# Comparaison "effectifs estimés" et "effectifs observés"
xres <- fctModelVariable(resNLMG$estimate)
NJE <- round(xres[[1]]*NJT)
NJE
NJO
NAE <- round(xres[[2]]*NAT)
NAE
NAO
# Test de sous-modèle SM pour H0 : "ap=1.0 et aq=1.0"
fctModelVariable <- function( px ) {
  # Sous-Modèle particulier : SM
  Wprob <- fctModelEstimeProba(c(px,log(1.0),log(1.0)))
  Wprob } # FIN : fctModelVariable
# Sous-Modèle : "ap=1.0 et aq=1.0"
xDS <- list( c(NJT,NAT), NJO, NAO)
pinit <- c( log(-log(0.50)),log(-log(0.50)),log(-log(0.50)),log(-log(0.50)) )
resNLSM <- nlm(fctMVMG, pinit, xDS, hessian=T)
resNLSM
# Test de rapport de vraisemblance
LVMG <- resNLMG$minimum
nbparMG <- length(resNLMG$estimate)
LVSM <- resNLSM$minimum
nbparSM <- length(resNLSM$estimate)
Chi2Obs <- 2*(LVSM - LVMG)
deltapar <- (nbparMG - nbparSM)
Chi2Obs
deltapar
# P-value
1.0-pchisq(Chi2Obs,deltapar)
# Estimation des IC à 95% des paramètres dans l'échelle initiale
zpe <- resNLSM$estimate
zpv <- diag(solve(resNLSM$hessian))
zt <- 1.96
zpe1 <- zpe - (zt*sqrt(zpv))
zpe2 <- zpe + (zt*sqrt(zpv))
pEMOY <- exp(-exp(zpe[1:4]))
pEMIN <- exp(-exp(zpe2[1:4]))
pEMAX <- exp(-exp(zpe1[1:4]))
cbind(pEMIN,pEMOY,pEMAX)
# Comparaison "effectifs estimés" et "effectifs observés"
xres <- fctModelVariable(resNLSM$estimate)
NJE <- round(xres[[1]]*NJT)
NJE
NJO
NAE <- round(xres[[2]]*NAT)
NAE
NAO
```

Annexe 12 : Article sur la coinfection de *Borrelia* et *Bartonella*

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 35 (2012) 583–589



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid



Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest

Jean-Philippe Buffet^a, Maud Marsot^{b,c}, Elise Vaumourin^{a,b}, Patrick Gasqui^b, Sébastien Masségli^b, Elie Marcheteau^a, Dominique Huet^a, Jean-Louis Chapuis^c, Benoit Pisanu^c, Elisabeth Ferquel^d, Lénaïg Halos^e, Gwenaël Vourc'h^b, Muriel Vayssier-Taussat^{a,*}

^a USC INRA Bipar, *Bartonella* et Tiques, ANSES, 23 avenue du Général de Gaulle, 94 700 Maisons-Alfort, France

^b UR346 Epidémiologie Animale, INRA, 63122 Saint Genès Champanelle, France

^c UMR 7204 CNRS-P6-CERSP, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61 rue Buffon, CP 53, 75231 Paris Cedex 05, France

^d CNR *Borrelia*, Institut Pasteur 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^e Merial, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2012

Received in revised form 19 July 2012

Accepted 24 July 2012

Keywords:

Bank voles (*Myodes glareolus*)

Borrelia afzelii

Bartonella spp.

Diversity

Co-infection

ABSTRACT

We report the molecular detection of *Borrelia afzelii* (11%) and *Bartonella* spp. (56%) in 447 bank voles trapped in a suburban forest in France. Adult voles were infected by significantly more *Borrelia afzelii* than juveniles ($p < 0.001$), whereas no significant difference was detected in the prevalence of *Bartonella* spp. between young and adult individuals ($p = 0.914$). Six percent of the animals were co-infected by both bacteria. Analysis of the bank vole carrier status for either pathogen indicated that co-infections occur randomly ($p = 0.94$, $CI_{95} = [0.53; 1.47]$). Sequence analysis revealed that bank voles were infected by a single genotype of *Borrelia afzelii* and by 32 different *Bartonella* spp. genotypes, related to three known species specific to rodents (*B. taylorii*, *B. grahamii* and *B. doshiae*) and also two as yet unidentified *Bartonella* species. Our findings confirm that rodents harbor high levels of potential human pathogens; therefore, widespread surveillance should be undertaken in areas where humans may encounter rodents.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Rodents are recognized as a major reservoir of pathogens such as tick-borne diseases, which can cause serious illness in livestock and humans [1]. Tick-borne diseases are extraordinarily diverse and are responsible for high morbidity and mortality rates around the world. *Ixodes ricinus*, the most widespread and abundant tick in Western Europe, accounts for significant numbers of human bites and is a major vector of pathogens responsible for rodent-borne disease [2,3].

In Europe, the most prevalent tick-borne disease is Lyme borreliosis, caused by bacteria belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) complex [4]. Particular species of rodents are known to be infected by certain *Borrelia* species. *Borrelia afzelii* has been described as specific to smaller rodent species, including the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and bank vole (*Myodes glareolus*), while *B. burgdorferi* sensu stricto is found in other rodent hosts, such as the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) and brown rat (*Rattus norvegicus*) [5–7]. These *Borrelia* species are known causative agents of human disease [8] but in addition, they can assume an aggravating role when co-infected along with *Babesia* sp., *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., and *Bartonella*

* Corresponding author.

E-mail address: mveyssier@vet-alfort.fr (M. Vayssier-Taussat).

sp. in Lyme disease [9,10]. However the prevalence of these co-infections remains unknown as their diagnosis is exceedingly difficult.

At least ten of the 26 *Bartonella* spp. are asymptotically carried by rodents, and five of the rodent-specific *Bartonella* spp. (*B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. washoensis* and *B. tamiiae*) have been identified as zoonotic agents [11]. These bacteria induce diverse and species-dependent diseases in humans, but mostly cause bacteremia, myocarditis, endocarditis, lymphadenitis and hepatitis [12]. *Bartonella* spp. are mostly transmitted to rodents by vectors such as fleas (*Ctenophthalmus nobilis nobilis* for voles) [13] and to a lesser extent, ticks (*I. ricinus*) [14].

In recent times, outdoor activities in suburban forests have been increasing, consequently providing excellent conditions for contact between rodents, arthropod vectors and humans. Thus for the exposed human population, there is an urgent need to conduct studies investigating the numbers of rodents carrying vector-borne zoonotic pathogens. Therefore this study was undertaken to obtain an initial assessment of the prevalence, diversity and co-infection rates of *B. burgdorferi* sensu lato and *Bartonella* spp. within a population of bank voles (*M. glareolus*), the most abundant diurnal murid species in the studied site, a highly visited suburban forest [15].

1. Material and methods

1.1. Study site, trapping and animal processing

The study was conducted in the Sénart Forest (3200 ha, 02°29'E, 48°40'N), which is located 22 km from Paris (France) between the months of March and October over a four-year period (2006–2009). This forest is essentially composed of broad-leaved trees dominated by oaks (*Quercus robur*, *Quercus pedunculata*) and European hornbeams (*Carpinus betulus*), with two other forest tree species, the sweet chestnut (*Castanea sativa*) and the lime tree (*Tilia vulgaris*). Infection prevalence was studied in 447 bank voles trapped within a grid system consisting of 104 geo-localized Sherman® baited traps. For all captured individuals, sex was determined and the age class (juvenile and adult) evaluated by coupling the date of capture and the body weight. For *B. burgdorferi* s.l. detection, ear biopsy was obtained by cutting a small piece from the ear of the trapped voles (maximum 3 mm²) with scissors, then immediately storing the sample in 90% ethanol [7]. The bank voles were then sacrificed and their spleens removed under sterile conditions and stored at –80 °C until they were to be used for *Bartonella* spp. detection.

1.2. DNA extraction

For *Borrelia* analysis, DNA from one ear biopsy per bank vole was extracted using the NucleoSpin® Tissue kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) [7].

The presence of *Bartonella* spp. was detected by extracting DNA from spleen samples of each bank vole. First, a piece of the sample was ground in 500 µl of F-12 nutrient

mixture medium (Invitrogen) and 250 µl of this mixture were placed in a Lysing Matrix E tube (MP Biomedical, Solon, USA). Then, 500 µl of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer and 500 µl of phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1; pH 8.0) were added to the sample. Extraction buffer was prepared by mixing equal volumes of 10% (w/v) CTAB (Sigma–Aldrich, France) in 0.7 M NaCl with 240 mM potassium phosphate buffer, at pH 8.0. Samples were homogenized and lysed for 30 s at a speed setting of 6500 rpm in a Precellys 24 centrifuge (Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France). The aqueous phase, containing nucleic acids, was separated by centrifugation at 16,000 × g for 5 min at 4 °C, and transferred to a new microcentrifuge 2 ml tube. Phenol was extracted by adding an equal volume of chloroform–isoamyl alcohol (24:1), mixing the tubes by inversion then centrifuging for 5 min at 16,000 × g (4 °C). The nucleic acids present in the aqueous phase were precipitated by adding two volumes of 30% (w/v) polyethylene glycol (Fluka Biochemica, Sigma–Aldrich, France) – 1.6 M NaCl solution for 2 h at room temperature. The tubes were then centrifuged for 10 min at 18,000 × g (4 °C). The pelleted nucleic acids were washed in ice-cold 70% (v/v) ethanol and then centrifuged at 10,000 × g for 3 min (4 °C). The ethanol was eliminated, and the pellets were air dried, and then resuspended in 50–200 µl of Tris–EDTA buffer (pH 7.4), depending on their size, and stored overnight at 4 °C.

1.3. PCR amplification and sequencing

PCR analysis for *B. afzelii* was carried out using DNA extracted from the ears, and *Bartonella* spp. detection was performed using DNA extracted from the spleen.

Each reaction was carried out in a total volume of 25 µl containing; 0.5 mmol/ml of each primer, 2.5 mM of each dNTP, 2.5 µl of 10× PCR buffer, 1 U of Taq DNA polymerase (Takara Biomedical Group, Shiga, Japan) and 5 µl of the DNA extract. The PCR was performed in a MyCycler thermocycler (Bio-Rad, Strasbourg, France). Negative and positive controls were included in each run, (water and then either genomic DNA of *B. burgdorferi* sensu stricto isolated in our laboratory or genomic DNA of *B. birtlesii* strain IBS 325).

The presence of *B. afzelii* in the extracted DNA has been detected using a PCR that targets the *rrs* gene (16S rRNA) [7]. The intergenic 16S(*rrs*)–23S(*rrlA*) spacer (IGS) was then used in this study to characterize the diversity of *B. afzelii* as previously described [16].

The presence of *Bartonella* spp. was determined by using a portion of the *gltA* gene encoding for the citrate synthase protein, previously shown to be a reliable tool for distinguishing *Bartonella* spp. and closely related genotypes [17]. The *gltA* fragment was amplified by PCR using primers specific to the *Bartonella* genus [18].

The amplification products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels with 0.1 mg/ml of ethidium bromide and imaged under UV light. PCR products obtained from positive samples were then purified and sequenced in both directions by Eurofins MWG Operon (Germany).

1.4. Phylogenetic analysis and construction of phylogenetic trees for *gltA* and IGS sequences

Sequences were analyzed using the sequence analysis software Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA), which determined the consensus sequence for the amplified region of the *gltA* gene and the intergenic 16S(*rrs*)–23S(*rrlA*) spacer. Sequence data were aligned with those of typed strains of *Bartonella* and *Borrelia* species using CLUSTAL W software (included in MEGA 5). MEGA 5 software (<http://www.megasoftware.net/>) [19] was used to calculate the DNA sequence similarities (P-distance). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining (NJ) method, combined with the Jukes-Cantor parameters method. Bootstrap analysis was carried out on 1000 replications. Sequences were also analyzed by the BLASTn algorithm [20] to identify the closest relative.

1.5. Data analysis

Co-infections by *B. afzelii* and *Bartonella* spp., as well as rodent age compared to the carrier-status for each pathogen, were statistically evaluated using the chi-squared test and the software Epi Info version 3.5.3 (CDC, Atlanta, GA, USA). A two-tailed Fisher's exact test was used when the expected numbers of observations were less than five. A *p*-value of <0.05 was considered to be statistically significant. The diversity of *Bartonella* spp. sequences was calculated using the Hunter and Gaston discrimination index [21].

2. Results

B. afzelii rrs was detected in 49 of the 447 bank voles (11%), and infected more adults than juveniles, at levels of 14.4% and 1.7% respectively ($p < 0.001$). IGS sequences were all identical (100% identity – accession number: JQ693994) and shared 93.8% identity with the *B. afzelii* IGS sequence amplified from *I. ricinus* collected in southern Sweden (accession number AY363694) [16]. The phylogenetic tree based on the IGS fragment showed that the unique *B. afzelii* sequence identified here is distant from all other IGS *B. afzelii* sequences amplified from rodents, ticks and humans from Sweden, UK and Latvia, with a pairwise sequence dissimilarity that ranged between 4.8% and 6.4% (Fig. 1).

The *Bartonella* spp. specific fragment of the *gltA* gene was amplified from 252/447 bank voles (56.4%). Prevalence rates were similar in juveniles (56.7%) as in adults (56.3%) ($p = 0.915$, $CI_{95} = [0.72; 1.34]$). Sequence analysis of *gltA* fragments revealed the presence of 32 different *gltA* genotypes (unique sequence variants with ≥ 1 nucleotide difference). The percentage identity of the *gltA* sequence with known *Bartonella* type strains ranged from 91 to 100%. Simpson's index was 0.85, indicating that a diverse range of *Bartonella* spp. *gltA* amplicons was found in the bank voles. A phylogenetic tree based on the partial sequence of the *gltA* gene is shown in Fig. 2. The 32 *gltA* genotypes were distributed in four clades along the *gltA* dendrogram, i.e., A, B, C and D (Fig. 2), and which are detailed as follows.

Of these 32 genotypes, 12 belonged to clade A (A32RCG, A42FCG, A60RCG, A252FCG, A286FCG, A343RCG, A351FCG,

A364FCG, A479FCG, A573FCG, A597FCG, A641RCG). They showed 95.9 to 98.8% similarity to *Bartonella taylorii* type strain (AF191502). Those genotypes were closely related (97–100% similarity) to *Bartonella* strains (AY435106, AY435113, AF391790 and GU338962) isolated from field mice (*Apodemus flavicollis*) live-trapped in Greece, Sweden and Poland [22–24].

Clade B contained 11 genotypes, 10 of which (A8RCG, A53RCG, A55RCG, A138RCG, AR183RCG, A186RCG, A191RCG, A306RCG, A321FCG, A373FCG) were related to a *Bartonella* strain (FJ946856) recovered from stray dogs in Thailand [25] with 96.2–100% similarity. One genotype (A188RCG) represented a unique sequence which differed from all previously described *Bartonella* strains or sequences (<95% identity).

Clade C contained seven genotypes. Six of which (A142R, A143R, A216F, A296F, A509F and A582R), exhibited the closest phylogenetic relationship (94–100%) to *B. grahamii* (Z70016), a bacterium isolated from various rodent species worldwide [26] and potentially pathogenic to humans [27]. One genotype from clade C (A199RCG) also represented a unique sequence which differed from all previously described *Bartonella* strains or sequences (<92% identity).

Clade D clustered two genotypes (A543R and A636F), both closely related to a *B. doshiae* type strain (Z70017) (97.9 and 98.8% respectively), originally isolated from rodents in the United Kingdom [28].

The most frequently found *Bartonella* were genotypes belonging to clade A (closely related to *B. taylorii* type strain) detected in 58.8% (148/252) of the animals. Less frequent were genotypes from clade B in 21.4% (54/252) of the animals, genotypes A142R, A143R, A216F, A296F, A509F and A582R (from clade C and related to *B. grahamii*) in 16.3% (41/252) of animals, and genotypes of clade D (related to *B. doshiae*) in 2.8% (7/252) of animals. The two novel *Bartonella* genotypes A188R and A199R (from clades B and C) were each detected in only one specimen.

Co-infections were detected in 27/447 bank voles (6%) screened for the presence of *B. afzelii* and *Bartonella* spp. No trends of association or exclusion between the two bacteria were observed ($\chi^2 = 0.4$, $p = 0.849$, $CI_{95} = [0.53; 1.47]$).

Co-infections occurred between *B. afzelii* and different *Bartonella* genotypes distributed throughout all clades. The *Bartonella* genotypes implicated in co-infections were, A351F and A364F (from clade A), closely related to *B. taylorii*; A373F, A8R and A53R, A188R belonging to clade B; A216F from clade C, which showed 100% relatedness to *B. grahamii* type strain, and A636F (clade D), with similarity to *B. doshiae*.

3. Discussion

This work is the first demonstration that bank voles are significantly infected with diverse *Bartonella* spp. (56.4%) and to a lesser extent with a single *B. afzelii* strain (11%), and also demonstrate a co-infection rate of 6%.

B. afzelii has already been shown to be present in rodents and some insectivore species at similar levels [4,29]. In our study, we identified one single genotype in bank voles in the geographical region studied. Interestingly, introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) and *I. ricinus* ticks

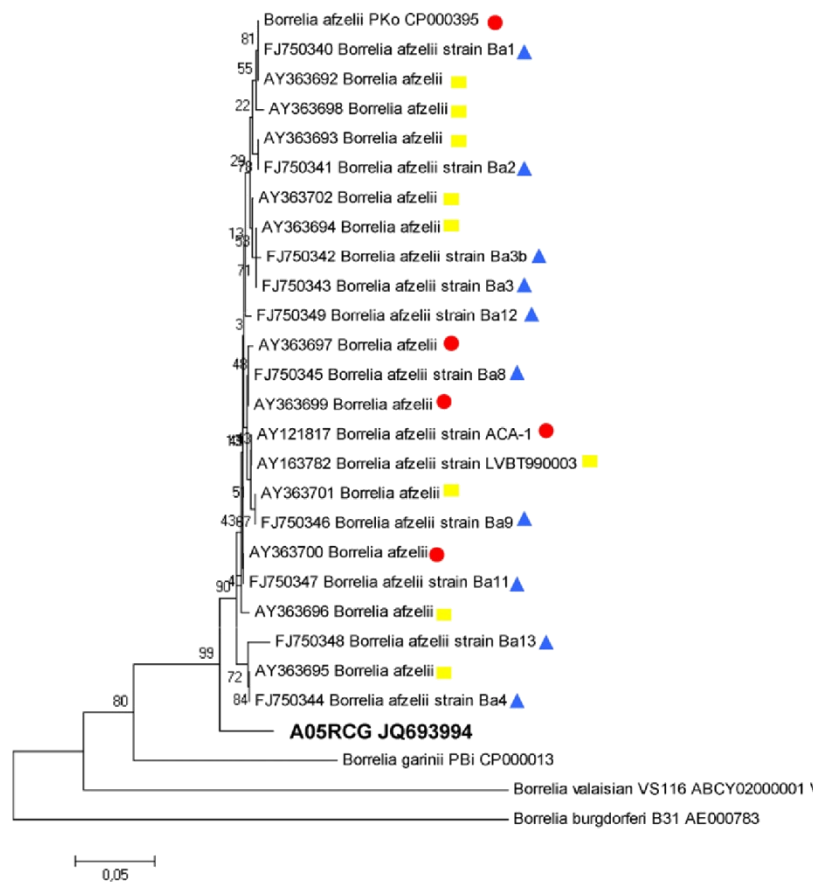


Fig. 1. Phylogenetic relationships between the unique *Borrelia afzelii* genotype detected in the population of bank voles from the Sénart forest (France) and several *Borrelia* spp. type strains, based on the sequence of the intergenic 16S(*rrs*)–23S(*rmlA*) spacer (IGS). The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method. Bootstrap analysis was carried out on 1000 replications; values are indicated at the nodes. Genbank accession numbers are indicated for each sequence used. The sequence of *Leptospira biflexa* strain Patoc 1 (accession number: NC010502) was chosen as an outgroup in the phylogenetic tree. Symbols indicate the host origin of the amplified IGS sequence: (●) humans, (▲) rodents, (■) ticks. All sequences came from southern Sweden except PKO (CP000395) isolated in UK and LVT990003 (AY163782) isolated in Latvia.

collected in the same site and during the same period as our study were found to harbor three different species in the *B. burgdorferi* complex: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, and *B. garinii*, suggesting that bank voles are exclusively tolerant to *B. afzelii* [7,30]. At various European sites, *B. afzelii* strains have been shown to exhibit restricted movement between geographic regions [31]. Moreover, Hellgreen and colleagues [32] showed that three different genetic loci of *B. afzelii* increased in stability as the geographical scale decreased, despite the occurrence of frequent recombination events. This suggests that specific *B. afzelii* strains are only associated with specific geographical regions, due to physical barriers and limited rodent movement. This could explain the low diversity of *B. afzelii* found in this study, as well as the differences between the *B. afzelii* genotypes reported here compared to those detected in other European countries [32].

Concerning *Bartonella* spp., the rodent infection rate observed in our study was similar to levels reported in many studies from different geographical areas: 52.4% in western USA [33], 62% in the United Kingdom [34], and 57% in Canada [35]. Conversely, studies conducted in southern

China and northern USA revealed *Bartonella* rodent infection rates exceeded 80% [36,37]. The presence of such high levels of *Bartonella* in rodent communities is still unexplained. In all these studies, as in ours, rodent-associated *Bartonella* species were genetically very diverse.

Our results also agree with those of Inoue and colleagues [26], who demonstrated that the different *B. grahamii* strains sampled from all over the world tend to be associated with a geographical region on a large scale, but that a strict association of strains with a specific rodent host did not seem to occur. In the bank vole population studied here, the genotypes from clade B, (except A188R) which formed a well-demarcated cluster (Fig. 2), were similar to a *Bartonella* sequences recovered from the blood of stray dogs in Thailand [25] and might represent a new species. Two unique genotypes, A188R from clade B and A199R from clade C showed less than 96% similarity with known *Bartonella* strains or sequences, suggesting the presence of two new species according to the criteria specified by La Scola et al. [17]. The exact taxonomic positions of these *Bartonella* genotypes now need to be further characterized by MLST or MLSA.



Fig. 2. Phylogenetic relationships among partial citrate synthase sequences (*gltA*) from the 32 *Bartonella* genotypes examined here and from known *Bartonella* species. The phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method. Bootstrap values (percentage of 1000 replications) are indicated at the nodes. Genbank accession numbers are indicated for each sequence used. The sequence of *Brucella melitensis* strain 16 M (accession number: NC003317) was chosen as an outgroup in the phylogenetic tree. The four clades that contained the genotypes recovered here are highlighted by boxes and labelled as follows: A, B, C, and D.

We found a significant difference in the prevalence of *B. afzelii* between young and adult individuals. Juvenile bank voles are known to have lower levels of tick infestation compared to adults [38], most likely explained by the fact that juveniles inhabit a more confined physical environment, thereby limiting their exposure to *I. ricinus* [4]. In contrast to *B. afzelii*, we did not find any difference in *Bartonella* spp. prevalence in young and adult individuals. Hence, we hypothesize that the lack of difference between juveniles and adults suggests a similar exposure of both age groups to fleas, the major rodent *Bartonella* spp. vector, due to intimate contact between parents and their offspring in the burrow.

Wild populations are generally infected by more than one parasite type, which can result in different interactions between the parasites themselves, but also between the parasites and the host. Recent studies in a natural population of field voles (*Microtus agrestis*), demonstrated that the presence of cowpox virus increased vole susceptibility to *B. taylorii* infection, as well as the duration of bacteremia. In contrast, *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophilum* had a negative effect on *B. taylorii* infection probably due to an immune mediated response (cross immunity) and/or a competition for resources [39]. Six percent of the 447 bank voles screened here were co-infected with *Borrelia afzelii* and *Bartonella* genotypes. Considering that the *Bartonella* spp. bank vole infection rate was around 56% in our study, half of the *Borrelia*-infected rodents were also infected with diverse *Bartonella* spp. suggesting that co-infections by the two bacteria occur randomly and are not correlated.

To our knowledge, this is the first study to assess the prevalence of both *Bartonella* and *Borrelia* species in rodents in a suburban forest, providing supplementary data about the geographic distribution and diversity of these vector-borne zoonotic bacteria. We also demonstrate the coexistence of both zoonotic pathogens in bank voles, but without apparent interactions. These preliminary data call for additional investigations to determine the impact of such pathogens on human health, especially when disease symptoms persist after exposure to rodents/arthropods for which no etiological agent has been identified.

Conflict of interests

The authors declared that they have no competing interests.

Acknowledgments

This study was partially funded by EU Grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext024 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. We also thank the group Tiques et Maladies à Tiques group (TMT) of Réseau Ecologie des Interactions Durables for stimulating discussion and support. We thank Valérie Poux for help with the molecular biology analyses and Nelly Dorr for data management.

References

- [1] Meerburg BG. Rodents are a risk factor for the spreading of pathogens on farms. *Veterinary Microbiology* 2010;142:464–5 (author reply 466).
- [2] Cotte V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M. Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2010;10:723–30.
- [3] Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, et al. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Applied and Environment Microbiology* 2010;76:4413–20.
- [4] Humair P, Gern L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection* 2000;2:915–22.
- [5] Humair PF, Peter O, Wallich R, Gern L. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *Journal of Medical Entomology* 1995;32:433–8.
- [6] Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution* 2011.
- [7] Marsot M, Sigaud M, Chapuis JL, Ferquel E, Cornet M, Vourc'h G. Introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barberi*) harbor more-diverse *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies than Native Bank Voles (*Myodes glareolus*). *Applied and Environment Microbiology* 2011;77:5716–21.
- [8] Gern L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Current Problems in Dermatology* 2009;37:18–30.
- [9] Eskow E, Rao RV, Mordechai E. Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Archives of Neurology* 2001;58:1357–63.
- [10] Mayne PJ. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis, bartonellosis, and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *International Journal of General Medicine* 2011;4:845–52.
- [11] Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology* 2010;109:743–50.
- [12] Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology* 2011;301:7–15.
- [13] Bown KJ, Bennet M, Begon M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:684–7.
- [14] Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011;5:e1186.
- [15] Pisanu B, Jerusalem C, Huchery C, Marmet J, Chapuis JL. Helminth fauna of the Siberian chipmunk, *Tamias sibiricus Laxmann* (Rodentia, Sciuridae) introduced in suburban French forests. *Parasitology Research* 2007;100:1375–9.
- [16] Bunikis J, Garpmo U, Tsao J, Berglund J, Fish D, Barbour AG. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology* 2004;150:1741–55.
- [17] La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology* 2003;11:318–21.
- [18] Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33:1797–803.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011.
- [20] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 1990;215:403–10.
- [21] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 1988;26:2465–6.
- [22] Tea A, Alexiou-Daniel S, Papoutsis A, Papa A, Antoniadis A. *Bartonella* species isolated from rodents, Greece. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:963–4.
- [23] Holmberg M, Mills JN, McGill S, Benjamin G, Ellis BA. *Bartonella* infection in sylvatic small mammals of central Sweden. *Epidemiology and Infection* 2003;130:149–57.
- [24] Paziewska A, Harris PD, Zwolinska L, Bajer A, Sinski E. Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. *Microbial Ecology* 2011;61:134–45.

- [25] Bai Y, Kosoy MY, Boonmar S, Sawatwong P, Sangmaneeet S, Peruski LF. Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Veterinary Microbiology* 2010;146:314–9.
- [26] Inoue K, Kabeya H, Kosoy MY, Bai Y, Smirnov G, McColl D, et al. Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. *Microbial Ecology* 2009;57:534–41.
- [27] Kerkhoff FT, Bergmans AM, van Der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:4034–8.
- [28] Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1995;45:1–8.
- [29] Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environment Microbiology* 1998;64:1169–74.
- [30] Reis C, Cote M, Paul RE, Bonnet S. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011;11:907–16.
- [31] Vollmer SA, Bormane A, Dinnis RE, Seelig F, Dobson AD, Aanensen DM, et al. Host migration impacts on the phylogeography of Lyme *Borrelia* spirochaete species in Europe. *Environmental Microbiology* 2011;13:184–92.
- [32] Hellgren O, Andersson M, Raberg L. The genetic structure of *Borrelia afzelii* varies with geographic but not ecological sampling scale. *Journal of Evolutionary Biology* 2011;24:159–67.
- [33] Bai Y, Kosoy MY, Cully JF, Bala T, Ray C, Collinge SK. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiology Ecology* 2007;61:438–48.
- [34] Birtles RJ, Harrison TG, Molyneux DH. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1994;88:317–27.
- [35] Jardine C, Appleyard G, Kosoy MY, McColl D, Chirino-Trejo M, Wobeser G, et al. Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan, Canada. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2005;5:402–9.
- [36] Ying B, Kosoy MY, Maupin GO, Tsuchiya KR, Gage KL. Genetic and ecologic characteristics of *Bartonella* communities in rodents in southern China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;66:622–7.
- [37] Bai Y, Calisher CH, Kosoy MY, Root JJ, Doty JB. Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. *Applied and Environment Microbiology* 2011;77:1728–31.
- [38] Pisanu B, Marsot M, Marmet J, Chapuis JL, Reale D, Vourc'h G. Introduced Siberian Chipmunks are more heavily infested by Ixodid ticks than are native bank voles in a suburban forest in France. *International Journal for Parasitology* 2010;40:1277–83.
- [39] Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, et al. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 2010;330:243–6.

Glossaire

Agents pathogènes : Les *parasites* peuvent être définis comme des agents pathogènes ou des *agents infectieux*. Dans ce cas-là, l'accent est mis sur leur caractère pathogène pour l'hôte (*i.e.* impactant la fitness de l'hôte), or certains parasites peuvent ne pas être pathogènes (*e.g.* flore intestinale) ou n'être pathogènes que pour certains hôtes en particulier (Anderson & May 1979).

Antagonisme (entre parasites) : Les relations antagonistes représentent les associations négatives entre organismes. Elles concernent plus particulièrement les interactions entre parasites dans lesquelles l'un des parasites (et *vice versa* si les interactions sont réciproques) diminue le risque d'infection et/ou atténue les symptômes causés par d'autres parasites (Grmek 1969).

Association : Une association de parasites est une co-occurrence de parasites présente plus souvent qu'attendue au hasard.

Asymptomatique : Un individu asymptomatique est un individu ne manifestant pas de symptômes ou de signes cliniques lors d'une infection par un parasite. Cet individu est tout de même susceptible de transmettre ce parasite.

Biocénose : La biocénose est l'ensemble des êtres vivants qui occupent un milieu donné (le biotope), en interaction les uns avec les autres et avec ce milieu. La biocénose forme, avec son biotope, un écosystème.

Charge parasitaire : La charge parasitaire est le nombre d'individus parasites par individu hôte.

Coinfection : Infection concomitante d'un hôte par plusieurs parasites. On parle aussi d'infections multiples ou de *multi-infections*, de *co-occurrences*, de *co-présences*, de *polyparasitisme* ou de *multiparasitisme*.

Communauté écologique : Une communauté écologique est un assemblage d'espèces interagissant ensemble dans une aire géographique donnée, espèces dont les fonctions et les dynamiques sont dans un certain sens interdépendantes (Putman 1994).

Dogme : Un dogme est une affirmation considérée comme fondamentale, incontestable et intangible par une autorité.

Échantillon : En statistique, un échantillon est un ensemble d'individus censé être représentatif d'une population. Les observations, faites à partir de l'échantillon, pourront être généralisées à l'ensemble de la population.

Épidémie : Une épidémie désigne l'apparition, le développement ou la propagation rapide d'une maladie infectieuse aux effets significatifs, augmentant l'incidence de cette maladie au sein d'une population par rapport à la normale.

Facteur de risque : La co-occurrence de parasites, chez un hôte, peut résulter de facteurs de risque communs (*e.g.* spatiaux, temporels, géographiques, comportementaux), qui créent des associations statistiques entre les parasites, sans qu'il y ait pourtant de réelles interactions biologiques. Nous pouvons alors dire que les parasites sont associés écologiquement *via* différents facteurs d'exposition liés notamment à la répartition spatiale des hôtes et/ou des parasites, ou *via* des facteurs intrinsèques aux hôtes et/ou aux parasites liés notamment aux traits d'histoire de vie.

Fécondité : La fécondité exprime la capacité des espèces vivantes, animales ou végétales à se reproduire et à assurer la perpétuation de l'espèce.

Fitness : La fitness est la capacité moyenne d'un individu à produire des descendants matures par rapport aux autres individus de la même population et au même moment. Elle mêle à la fois le taux de survie et le taux de fécondité des individus. On parle aussi de *valeur sélective* ou de *valeur adaptative*.

Hôte : Un hôte est un organisme nécessaire au cycle de vie d'un ou de plusieurs parasites. Les hôtes peuvent être réservoir ou occasionnel suivant leurs implications dans le cycle de vie des parasites.

Immunité croisée : Le terme d'immunité croisée décrit le phénomène de reconnaissance des antigènes de parasites différents par les mêmes anticorps et cellules T (*i.e.* réponses spécifiques du système immunitaire de l'hôte aux infections). Le degré d'immunité croisée dépend uniquement du degré de similarité antigénique des parasites, celui-ci n'est pas forcément lié à leur apparentement phylogénétique.

Immunomodulation : L'immunomodulation est la modulation du système immunitaire de l'hôte par les parasites. Cette modulation peut avoir lieu au travers d'*immunosuppression*, e.g. suppression de certaines molécules du système immunitaire de l'hôte, telles que les interleukines et les lymphocytes. La modulation peut également être à l'origine d'augmentation de la production de certaines molécules du système immunitaire (e.g. interleukines, anticorps), il s'agit alors d'*immunoprotection*.

Incidence (d'une maladie) : L'incidence correspond au nombre de nouveaux cas (nouveaux individus infectés) dans un intervalle de temps particulier.

Indépendance (entre parasites) : Lorsque des parasites sont indépendants, ils n'ont aucune influence les uns sur les autres une fois dans l'hôte (ni sur le risque d'infection, ni sur les symptômes) et leurs dispersions dans une population d'hôtes donnée sont indépendantes également (Grmek 1969).

Infection : L'infection est le terme désignant l'entrée d'un parasite dans un organisme. Elle peut avoir des conséquences pathologiques ou cliniques. Toutefois, elle peut aussi être asymptomatique. Elle peut être *chronique*, c'est-à-dire perdurant dans le temps, ou *aiguë*, c'est-à-dire courte et transitoire.

Interactions biologiques entre parasites : Les réelles interactions biologiques entre parasites sont des interactions pouvant avoir lieu *via* des phénomènes de compétition, d'immunomodulation et des mécanismes moléculaires.

Interactions statistiques entre parasites : Les interactions statistiques entre parasites ne sont pas dues à des interactions biologiques, mais à des facteurs de risque communs. En effet, des parasites peuvent co-circuler même s'ils n'interagissent pas biologiquement.

Maladie émergente : Une maladie émergente ou ré-émergente est une maladie dont la distribution géographique, le nombre d'espèces hôtes ou le taux d'incidence a significativement augmenté par rapport à la situation épidémiologique habituelle, ou risque d'augmenter dans un avenir proche.

Microbiome : Le microbiome désigne la somme des microorganismes vivants dans ou sur un organisme animal ou végétal ou dans un environnement donné.

Modélisation : La modélisation est la conception d'un modèle pour approximer la réalité étudiée.

Paradigme : Un paradigme est un concept théorique dominant dans une communauté scientifique donnée à une certaine époque, à la base d'interprétations et de découvertes dans la science considérée.

Parasite : Le terme de parasite désigne toute entité vivant au dépens d'un ou plusieurs organismes, des hôtes (Windsor 2000). Les parasites sont non seulement nourris, abrités et transportés par leurs hôtes, mais sont aussi en mesure de modifier significativement la physiologie de leurs hôtes, leur comportement et même d'impacter leur évolution. On distingue les *endoparasites* qui vivent dans leur hôte, des *ectoparasites* qui vivent à la surface de l'hôte. Les *microparasites* regroupent les parasites de petite taille et qui tendent à se reproduire rapidement dans l'hôte (virus, bactérie, champignons, protozoaires). Tandis que les *macroparasites* sont plus grands et se reproduisent généralement *via* la transmission de stades libres (helminthes, métazoaires). Les parasites peuvent être décrits comme des *généralistes*, lorsqu'ils sont adaptés à plusieurs espèces hôtes, ou comme des *spécialistes*, lorsqu'ils sont adaptés à une seule espèce hôte.

Pathobiome : Le pathobiome est l'ensemble des agents pathogènes dans un organisme ou un environnement spécifique, par exemple le pathobiome de la tique.

Pathogénicité : La pathogénicité est le pouvoir d'un organisme (virus, bactéries, champignon, protozoaire, ...) ou d'une substance à causer une maladie ou à impacter la fitness de l'organisme infecté. La pathogénicité, ou le *pouvoir pathogène*, d'un agent infectieux correspond au rapport du nombre d'individus qui présentent la maladie clinique sur le nombre d'individus exposés à l'agent infectieux. Le terme est souvent employé à tort comme synonyme de virulence.

Population : Une population est un groupe d'individus partageant les mêmes paramètres démographiques et une ascendance commune plus probable avec les individus de la même unité qu'avec des individus d'autres populations définies comme telles.

Prévalence d'infection : La prévalence d'infection est une mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Elle correspond à la proportion d'individus portant le parasite dans une population à un instant particulier.

Réservoir d'infection : Un réservoir peut être une espèce, une population ou une communauté dans lequel un parasite d'intérêt peut être maintenu de manière permanente et à partir de laquelle il est transmis à une population cible. Si l'une des composantes du réservoir, comme une espèce d'hôte en particulier, vient à disparaître le parasite ne pouvant plus se maintenir disparaît à son tour (Viana *et al.* 2014).

Résistance (à une infection) : La résistance est la capacité d'un hôte à limiter la charge parasitaire (Råberg *et al.* 2007, 2009). L'hôte attaque directement le parasite afin de contrôler sa multiplication ou de l'éliminer.

Sensibilité : La sensibilité d'un test mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsque l'hypothèse est vérifiée.

Spécificité : La spécificité d'un test mesure sa capacité à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée.

Symptomatique : Un individu symptomatique est un individu qui manifeste des symptômes ou des signes cliniques lors d'une infection par un parasite.

Synchrone : Un phénomène synchrone est un phénomène qui a lieu en même temps ou qui a la même fréquence qu'un autre phénomène.

Synergisme (entre parasites) : Les relations synergiques représentent les associations positives entre organismes. Elles concernent plus particulièrement les interactions entre parasites dans lesquelles l'un des parasites (et *vice versa* si les interactions sont réciproques) augmente le risque d'infection et/ou aggrave les symptômes causés par d'autres parasites (Grmek 1969).

Trade-off (compromis évolutif) : Un « trade-off » est un compromis adaptatif entre deux caractères (ou plus) qui ne peuvent être optimisés simultanément.

Trait d'histoire de vie : Les traits d'histoire de vie d'un individu correspondent à la distribution des événements majeurs au cours de sa vie qui contribuent directement à la production et la survie des descendants (Roff 1992, Stearns 1992, Thomas *et al.* 2012).

Transmission directe : La transmission d'un parasite est dite directe lorsqu'elle se réalise par contact direct entre individus infectés.

Transmission indirecte : La transmission d'un parasite est dite indirecte lorsqu'elle se réalise indirectement *via* des parasites libres ou *via* un vecteur.

Transmission vectorielle : La transmission d'un parasite est dite vectorielle lorsqu'elle se réalise par l'intermédiaire d'un vecteur.

Transmission verticale : La transmission d'un parasite est dite verticale lorsqu'elle se réalise d'une génération à l'autre, telle celle d'un parent à sa progéniture.

Vecteur : Un vecteur est un organisme, la plupart du temps un arthropode hématophage, qui assure la transmission active des parasites ou agents pathogènes d'un hôte à l'autre (*e.g.* moustiques, tiques, puces, phlébotomes). Le vecteur n'a pas uniquement un rôle de transporteur, plusieurs parasites se multiplient et se transforment dans le vecteur où ils acquièrent leur pouvoir infectant (*e.g.* *Plasmodium*, *Theileria*, *Babesia* ou *Leishmania*).

Virulence : la virulence est la capacité d'un parasite à se multiplier et à causer des dommages à son hôte (Calow 1998). Cette définition est essentiellement employée par les microbiologistes. Les écologistes et les biologistes évolutionnistes appliquent une définition plus restrictive de la virulence. Ils la définissent comme étant tous les dommages faits à l'hôte qui dépassent ceux nécessaires à la fitness du parasite elle-même (Read *et al.* 1999). Les définitions utilisées plus couramment ces dernières années en évolution des parasites sont celles qui mettent l'accent sur les effets induits par le parasite sur la fitness de l'hôte. Dans les études théoriques, la virulence est toujours définie comme étant la composante principale de la fitness des parasites.

Références bibliographiques



- Abu-Raddad L.J., Patnaik P. & Kublin J.G. (2006) Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. *Science*, **314**, 1603-6
- Adegnika A.A. & Kremsner P.G. (2012) Epidemiology of malaria and helminth interaction: a review from 2001 to 2011. *Current Opinion in HIV and AIDS*, **7**, 221-224
- Agresti A. (2002) Categorical data analysis. (2nd edition), 710. John Wiley & Sons, Inc.
- Akaike H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716-723
- Anderson R.M. & May R.M. (1979) Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature*, **280**, 361-367
- Anderson R.M. & May R.M. (1991) Infectious diseases of humans: dynamics and control. Oxford university press



- Baum L.E. & Petrie T. (1966) Statistical Inference for Probabilistic Functions of Finite State Markov Chains. *The Annals of Mathematical Statistics*, **37**, 1554-1563
- Baum L.E. & Eagon J.A. (1967) An inequality with applications to statistical estimation for probabilistic functions of Markov processes and to a model for ecology. *Bulletin of the American Mathematical Society*, **73**, 360
- Baum L.E. & Sell G.R. (1968) Growth transformations for functions on manifolds. *Pacific Journal of Mathematics*, **27**, 211-227
- Baum L.E., Petrie T., Soules G. & Weiss N. (1970) A Maximization Technique Occurring in the Statistical Analysis of Probabilistic Functions of Markov Chains. *The Annals of Mathematical Statistics*, **41**, 164-171.
- Baum L.E. (1972) An equality and associated maximization technique in statistical estimation for probabilistic functions of Markov processes. *Inequalities*, **3**, 1-8
- Behnke J.M. (2008) Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions or pure randomness? *Parasitology*, **135**, 751-66
- Bifulchi N., Deardon R. & Feng Z. (2013) Spatial approximations of network-based individual level infectious disease models. *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology*, **6**, 59-70
- Boraschi D., Abebe Alemayehu M., Aseffa A., Chiodi F., Chisi J., Del Prete G., Doherty T.M., Elhassan I., Engers H., Gyan B., Harandi A.M., Kariuki T., Kironde F., Kouriba B., Langhorne J., Laskay T., Medaglini D., Olesen O., Onyebujoh P., Palma C., Sauerwein R., Sibanda E., Steinhoff U., Tagliabue A., Thiel A., Vahedi M. & Troye-Blomberg M. (2008) Immunity against HIV/AIDS, malaria, and tuberculosis during co-infections with neglected infectious diseases: recommendations for the European Union research priorities. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**, e255
- Bord S., Druilhet P., Gasqui P., Abrial D. & Vourc'h G. (2014) Bayesian estimation of abundance based on removal sampling under weak assumption of closed population with catchability depending on environmental conditions. Application to tick abundance. *Ecological Modelling*, **274**, 72-79
- Bosch A.A., Biesbroek G., Trzcinski K., Sanders E.A. & Bogaert D. (2013) Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003057
- Bott N.J., Campbell B.E., Beveridge I., Chilton N.B., Rees D., Hunt P.W. & Gasser R.B. (2009) A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. *International Journal for Parasitology*, **39**, 1277-1287
- Buffet J.P., Marsot M., Vaumourin E., Gasqui P., Masegla S., Marcheteau E., Huet D., Chapuis J.L., Pisanu B., Ferquel E., Halos L., Vourc'h G. & Vayssier-Taussat M. (2012) Co-infection of *Borrelia afzelii* and *Bartonella* spp. in bank voles from a suburban forest. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **35**, 583-589



- Calow W. (1998) Handbook of environmental risk assessment and management. 590 p. Blackwell Science
- Chen C.Y.C. (2009) Weighted equation and rules - a novel concept for evaluating protein-ligand interaction. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **27**, 271-282
- Cheval J., Sauvage V., Frangeul L., Dacheux L., Guigon G., Dumey N., Pariente K., Rousseaux C., Dorange F., Berthet N., Brisse S., Moszer I., Bourhy H., Manuguerra C.J., Lecuit M., Burguiere A., Caro V. & Eloit M. (2011) Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 3268-3275
- Corbett E.L., Watt C.J., Walker N., Maher D., Williams B.G., Raviglione M.C. & Dye C. (2003) The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*, **163**, 1009-1021
- Courchamp F., Suppo C., Fromont E. & Bouloux C. (1997) Dynamics of two feline retroviruses (fiv and felv) within one population of cats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **264**, 785-794
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S. & Lipkin W.I. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, **318**, 283-287

Croft D.P., Krause J. & James R. (2004) Social networks in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271 Suppl 6**, S516-519

Csardi G. & Nepusz T. (2006) The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems* **1695**,

Currie C.R., Bot A.N.M. & Boomsma J.J. (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, **101**, 91-102



Efrony R., Atad I. & Rosenberg E. (2009) Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA3. *Current Microbiology*, **58**, 139-145

Ellegren H. (2008) Sequencing goes 454 and takes large-scale genomics into the wild. *Molecular Ecology*, **17**, 1629-1631

Esch G.W., Bush A.O. & Aho J.M. (1990) Parasite communities: patterns and processes. Chapman and Hall

Ezenwa V.O. & Jolles A.E. (2011) From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites. *Integrative and Comparative Biology*, **51**, 540-51



Fonseca M.O., Pang L.W., de Paula Cavaleiro N., Barone A.A. & Heloisa Lopes M. (2005) Randomized trial of recombinant hepatitis B vaccine in HIV-infected adult patients comparing a standard dose to a double dose. *Vaccine*, **23**, 2902-8

Fortuna M.A. & Bascompte J. (2008) The network approach in ecology. *Unity in Diversity: Reflections on Ecology after the Legacy of Ramon Margalef*. 371-393.

Franco D.J., Vago A.R., Chiari E., Meira F.C.A., Galvão L.M.C. & Machado C.R.S. (2003) *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Experimental Parasitology*, **104**, 54-61



Gasser R.B., Bott N.J., Chilton N.B., Hunt P. & Beveridge I. (2008) Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, **26**, 325-334

Godfrey S.S. (2013) Networks and the ecology of parasite transmission: A framework for wildlife parasitology. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **2**, 235-245

Gómez-Díaz E., Doherty Jr P.F., Duneau D. & McCoy K.D. (2010) Cryptic vector divergence masks vector-specific patterns of infection: an example from the marine cycle of Lyme borreliosis. *Evolutionary Applications*, **3**, 391-401

Griffiths E.C., Pedersen A.B., Fenton A. & Petchey O.L. (2014) Analysis of a summary network of co-infection in humans reveals that parasites interact most *via* shared resources. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**, 20132286

Grmek M.D. (1969) Préliminaires d'une étude historique des maladies. *Annales. Histoire, Sciences Sociales*, **24**, 1473-1483

Guernier V., Hochberg M.E. & Guégan J.-F. (2004) Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS Biology*, **2**, e141



Harms G. & Feldmeier H. (2002) Review: HIV infection and tropical parasitic diseases—deleterious interactions in both directions? *Tropical Medicine & International Health*, **7**, 479-488

Harris R.N., Brucker R.M., Walke J.B., Becker M.H., Schwantes C.R., Flaherty D.C., Lam B.A., Woodhams D.C., Briggs C.J., Vredenburg V.T. & Minbiole K.P. (2009) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal*, **3**, 818-24

Hellard E., Pontier D., Sauvage F., Poulet H. & Fouchet D. (2012) True *versus* false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses. *PLoS One*, **7**, e29618

Herrmann C., Gern L. & Voordouw M.J. (2013) Species co-occurrence patterns among Lyme borreliosis pathogens in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 7273-7280

Holt R.D., Dobson A.P., Begon M., Bowers R.G. & Schaubert E.M. (2003) Parasite establishment in host communities. *Ecology Letters*, **6**, 837-842



Ideker T. & Krogan N.J. (2012) Differential network biology. *Molecular Systems Biology*, **8**, 565

Inal J.M. (2003) Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, **51**, 237-244

J

- Jansen R., Yu H., Greenbaum D., Kluger Y., Krogan N.J., Chung S., Emili A., Snyder M., Greenblatt J.F. & Gerstein M. (2003) A Bayesian networks approach for predicting protein-protein interactions from genomic data. *Science*, **302**, 449-453
- Jesus Junior W.C., Paula Júnior T.J., Lehner M.S. & Hau B. (2014) Interactions between foliar diseases: concepts and epidemiological approaches. *Tropical Plant Pathology*, **39**, 1-18

K

- Kamal S.M. & El Sayed Khalifa K. (2006) Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunology*, **28**, 483-496
- Keesing F., Belden L.K., Daszak P., Dobson A., Harvell C.D., Holt R.D., Hudson P., Jolles A., Jones K.E., Mitchell C.E., Myers S.S., Bogich T. & Ostfeld R.S. (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, **468**, 647-52
- Khader S.A. & Kolls J.K. (2014) Editorial overview: Vaccines: Vaccines for infectious diseases: are we there yet? *Current Opinion in Immunology*, **28**, ix-x
- Kiemer L., Costa S., Ueffing M. & Cesareni G. (2007) WI-PHI: a weighted yeast interactome enriched for direct physical interactions. *Proteomics*, **7**, 932-943
- Kosoy M., Mandel E., Green D., Marston E., Jones D. & Childs J. (2004) Prospective studies of *Bartonella* of rodents. Part II. Diverse infections in a single rodent community. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, **4**, 296-305

L

- Lafferty K.D., Allesina S., Arim M., Briggs C.J., De Leo G., Dobson A.P., Dunne J.A., Johnson P.T., Kuris A.M., Marcogliese D.J., Martinez N.D., Memmott J., Marquet P.A., McLaughlin J.P., Mordecai E.A., Pascual M., Poulin R. & Thielges D.W. (2008) Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters*, **11**, 533-546
- Lecuit M. & Eloit M. (2014) The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 25
- Lello J., Boag B., Fenton A., Stevenson I.R. & Hudson P.J. (2004) Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature*, **428**, 840-844
- Lusseau D., Schneider K., Boisseau O.J., Haase P., Slooten E. & Dawson S.M. (2003) The bottlenose dolphin community of Doubtful Sound features a large proportion of long-lasting associations. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **54**, 396-405
- Lusseau D., Wilson B.E.N., Hammond P.S., Grellier K., Durban J.W., Parsons K.M., Barton T.R. & Thompson P.M. (2006) Quantifying the influence of sociality on population structure in bottlenose dolphins. *Journal of Animal Ecology*, **75**, 14-24

M

- Malakar R., Elkinton J.S., Hajek A.E. & Burand J.P. (1999) Within-host interaction of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus and *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**, 91-100
- Marsot M., Chapuis J.L., Gasqui P., Dozieres A., Maseglia S., Pisanu B., Ferquel E. & Vourc'h G. (2013) Introduced Siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barberi*) contribute more to lyme borreliosis risk than native reservoir rodents. *PLoS One*, **8**, e55377
- McCallum H., Barlow N. & Hone J. (2001) How should pathogen transmission be modelled? *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 295-300
- McCullagh P. & Nelder J.A. (1989) Generalized Linear Models. (2nd edition), Chapman & Hall/CRC
- Melián C.J. & Bascompte J.J. (2002) Complex networks: two ways to be robust? *Ecology Letters*, **5**, 705-708
- Meyers L.A., Pourbohloul B., Newman M.E., Skowronski D.M. & Brunham R.C. (2005) Network theory and SARS: predicting outbreak diversity. *Journal of Theoretical Biology*, **232**, 71-81
- Meyers L.A., Newman M.E. & Pourbohloul B. (2006) Predicting epidemics on directed contact networks. *Journal of Theoretical Biology*, **240**, 400-418
- Minard G., Tran F.H., Dubost A., Tran-Van V., Mavingui P. & Moro C.V. (2014) Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 59
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., Rocha B.C., Hall-Mendelin S., Day A., Riegler M., Hugo L.E., Johnson K.N., Kay B.H., McGraw E.A., van den Hurk A.F., Ryan P.A. & O'Neill S.L. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, **139**, 1268-1278
- Moutailler S., Michelet L., Chotte J., Féménia F., Le Naour E., Cote M., Pouille M.L., Vaumourin E., Gasqui P., Vourc'h G., Cosson J.F., Raoult D. & Vayssier-Taussat M. (2014) To be or not to be co-infected. *Parasites & Vectors*, **7**, O15



- Nacher M. (2011) Interactions between worms and malaria: good worms or bad worms? *Malaria Journal*, **10**, 259
- Newman M.E.J. (2011) Communities, modules and large-scale structure in networks. *Nature Physics*, **8**, 25-31
- Norris J.R. (1998) Markov chains. Cambridge university press



- Petney T.N. & Andrews R.H. (1998) Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology*, **28**, 377-393
- Pike T.W., Samanta M., Lindstrom J. & Royle N.J. (2008) Behavioural phenotype affects social interactions in an animal network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275**, 2515-2520
- Pisanu B., Chapuis J.-L., Dozières A., Basset F., Poux V. & Vourc'h G. (2014) High prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in the European red squirrel *Sciurus vulgaris* in France. *Ticks and Tick-borne Diseases*, **5**, 1-6
- Poisot T., Stanko M., Miklisova D. & Morand S. (2013) Facultative and obligate parasite communities exhibit different network properties. *Parasitology*, **140**, 1340-1345
- Polley L. (2005) Navigating parasite webs and parasite flow: emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. *International Journal for Parasitology*, **35**, 1279-1294
- Porreca G.J., Zhang K., Li J.B., Xie B., Austin D., Vassallo S.L., LeProust E.M., Peck B.J., Emig C.J., Dahl F., Gao Y., Church G.M. & Shendure J. (2007) Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nature Methods*, **4**, 931-936
- Poulin R. (1995) Phylogeny, ecology, and the richness of parasite communities in vertebrates. *Ecological Monographs*, 283-302
- Poulin R. (1998) Comparison of three estimators of species richness in parasite component communities. *The Journal of Parasitology*, **84**, 485-490
- Poulin R. (2007) Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology*, **134**, 763-76
- Poulin R. (2010) Network analysis shining light on parasite ecology and diversity. *Trends in Parasitology*, **26**, 492-498
- Putman R.J. (1994) Community Ecology. Chapman and Hall



- Råberg L., Sim D. & Read A.F. (2007) Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, **318**, 812-814
- Råberg L., Graham A.L. & Read A.F. (2009) Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 37-49
- Read A.F., Aaby P., Antia R., Ebert D., Ewald P.W., Gupta S., Holmes E.C., Sasaki A., Shields D.C., Taddei F. & Moxon R. (1999) What can evolutionary biology contribute to understanding virulence. *Evolution in Health and Disease*. 205-218. Oxford University Press
- Reis C., Cote M., Paul R.E. & Bonnet S. (2011) Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11**, 907-916
- Roff D.A. (1992) Evolution of life histories: theory and analysis. Chapman & Hall
- Rohde K. (2006) Nonequilibrium ecology. Cambridge University Press
- Roossinck M.J. (2011) The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 99-108
- Rutrecht S.T. & Brown M.J. (2008) The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. *International Journal for Parasitology*, **38**, 799-808



- Salvador A.R., Guivier E., Xuereb A., Chaval Y., Cadet P., Poulle M.L., Sironen T., Voutilainen L., Henttonen H., Cosson J.F. & Charbonnel N. (2011) Concomitant influence of helminth infection and landscape on the distribution of Puumala hantavirus in its reservoir, *Myodes glareolus*. *BMC Microbiology*, **11**, 30
- Schwarz G. (1978) Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, **6**, 461-464
- Sester M., Giehl C., McNerney R., Kampmann B., Walzl G., Cuchi P., Wingfield C., Lange C., Migliori G.B., Kritski A.L. & Meyerhans A. (2010) Challenges and perspectives for improved management of HIV/*Mycobacterium tuberculosis* co-infection. *European Respiratory Journal*, **36**, 1242-1247
- Sherlock C., Xifara T., Telfer S. & Begon M. (2013) A coupled hidden Markov model for disease interactions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C*, **62**, 609-627
- Sleator R.D. (2010) Probiotic therapy - recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathogens*, **2**, 2-5
- Specht S. & Hoerauf A. (2007) Does helminth elimination promote or prevent malaria? *The Lancet*, **369**, 446-447

- Stearns S.C. (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press
- Stiehm E.R. (2006) Disease *versus* disease: how one disease may ameliorate another. *Pediatrics*, **117**, 184-191
- Swanson S.J., Neitzel D., Reed K.D. & Belongia E.A. (2006) Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 708-727



- Telfer S., Birtles R., Bennett M., Lambin X., Paterson S. & Begon M. (2008) Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology*, **135**, 767-81
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S. & Begon M. (2010) Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, **330**, 243-246
- Thomas F., Guégan J.-F. & Renaud F. (2012) Ecologie et Evolution des systèmes parasités. De Boeck & Larcier
- Tompkins D.M., Dunn A.M., Smith M.J. & Telfer S. (2011) Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *Journal of Animal Ecology*, **80**, 19-38



- Vayssier-Taussat M., Moutailler S., Michelet L., Devillers E., Bonnet S., Cheval J., Hebert C. & Eloit M. (2013) Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS One*, **8**, e81439
- Vayssier-Taussat M., Albina E., Citti C., Cosson J.F., Jacques M.A., Lebrun M.H., Le Loir Y., Ogliastro M., Petit M.A., Roumagnac P. & Candresse T. (2014) Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 29
- Viana M., Mancy R., Biek R., Cleaveland S., Cross P.C., Lloyd-Smith J.O. & Haydon D.T. (2014) Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 270-279



- Wakefield J. (2007) A Bayesian measure of the probability of false discovery in genetic epidemiology studies. *The American Journal of Human Genetics*, **81**, 208-227
- Wimmer B., Craig B.H., Pilkington J.G. & Pemberton J.M. (2004) Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *International Journal for Parasitology*, **34**, 625-631
- Windsor D.A. (2000) Biocartels-units of ecology and evolution based on host-symbiont interrelationships. *Archives of the SciAesthetics Institute*, **1**, 4-12
- Wood C.L., Byers J.E., Cottingham K.L., Altman I., Donahue M.J. & Blakeslee A.M. (2007) Parasites alter community structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 9335-9339
- Woolhouse M.E.J. (2001) Population Biology of Multihost Pathogens. *Science*, **292**, 1109-1112



- Yee T.W. & Wild C.J. (1996) Vector Generalized Additive Models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* **58**, 481-493



- Zaph C., Uzonna J., Beverley S.M. & Scott P. (2004) Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nature Medicine*, **10**, 1104-1110
- Zarlenga D.S. & Higgins J. (2001) PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, **101**, 215-230

Modélisation statistique des associations et des interactions entre des parasites transmis par des vecteurs, à partir de données issues d'études transversales

Résumé : Le multiparasitisme et surtout les associations qui en découlent, ont une grande influence sur l'écologie des parasites concernés. Elle est d'autant plus grande que les parasites peuvent interagir et ainsi modifier leurs effets sur les hôtes. Cependant, l'identification des associations et interactions de parasites est complexe au niveau populationnel. Notre objectif était de modéliser les associations et les interactions multiparasitaires, notamment dans le cadre des parasites d'importance médicale, vétérinaire ou agronomique. Nous avons tout d'abord réalisé une revue bibliographique sur les différentes causes et conséquences du multiparasitisme ainsi que sur les méthodes et outils disponibles pour comprendre les phénomènes qui le génèrent. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la détection des associations multiparasitaires. Nous avons développé une nouvelle méthode « de screening des associations » pour tester statistiquement la présence d'associations de parasites à une échelle globale. Nous avons utilisé cette méthode pour identifier les associations et pour révéler précisément les parasites associés au sein de diverses populations d'hôtes. Puis, nous avons étudié les interactions entre les parasites. Nous avons développé un modèle pour identifier les interactions entre deux parasites vectorisés et persistants chez un hôte, à partir de données issues d'études transversales. L'une des voies de progression de la connaissance sur les interactions est la prise en compte des facteurs de risque communs. La prise en compte des interactions contribue à améliorer le diagnostic, les traitements et la prévention des maladies infectieuses.

Mots-clés : multiparasitisme, interactions, associations, parasites, vecteurs, modélisation statistique, études transversales.

Statistical modelling of associations and interactions between vector borne parasites, using data from cross-sectional studies

Abstract: Multiparasitism and specifically statistical associations among parasites, have a strong influence on the ecology of parasites. This influence reinforced when parasites interact and thus modify their effect on hosts. However, the identification of associations and interactions between parasites is complex at the population level. Our aim was to model multi-parasite associations and interactions, in particular for parasites of medical, veterinary or agricultural importance. We first present a review of the literature on the different causes and consequences of multiparasitism and the methods and tools available to better understand the phenomena that generate them. In a second step we worked on the detection of multi-parasite associations. We developed a new approach « association screening » to statistically test the presence of multi-parasite associations on a global scale. We used this method to identify associations and to reveal precisely associated parasites in different host populations. Then, we focused on the study of interactions between parasites. We developed a model to identify the interactions between two vector-borne and persistent parasites in a host, using data from cross-sectional studies. One way to increase our capacity to detect parasite interactions in populations is the taking into account common risk factors. Taking into account interactions increases diagnosis, treatments and prevention of infectious diseases.

Key-words: multiparasitism, interactions, associations, vectors, statistical modelling, cross-sectional studies.

Unités : INRA, UR346 d'Epidémiologie Animale, Route de Theix 63122 Saint Genès Champanelle et INRA-ANSES-ENVA, USC BIPAR, 23 rue du Général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort.